



Title	ラベル化可能な蛍光ソルバトクロミック色素の合成と化学センサーポリマーの開発
Author(s)	岸, 和樹
Citation	北海道大学. 博士(環境科学) 乙第7174号
Issue Date	2023-03-23
DOI	10.14943/doctoral.r7174
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/89680
Type	theses (doctoral)
File Information	Kishi_Kazuki.pdf



[Instructions for use](#)

ラベル化可能な蛍光ソルバトクロミック色素の合成 と化学センサーポリマーの開発

**(Synthesis of labelable fluorescent solvatochromic dyes
and development of chemical sensor polymers)**

北海道大学大学院環境科学院

岸 和樹

目次

第1章 序論.....	- 5 -
1.1「化学センサー」について.....	- 6 -
1.2「蛍光色素利用センサー」について.....	- 10 -
1.2.1 電気(エレクトロクロミズム)センサー.....	- 10 -
1.2.2 イオン(イオノクロミズム)センサー.....	- 10 -
1.2.3 溶媒(ソルバトクロミズム)センサー.....	- 15 -
1.3 本論文の研究目的.....	- 18 -
第2章 クリック反応に利用可能な新規エチニル基導入ソルバトクロミック色素とメリフ ィールドレジンを用いた Ca イオンセンサーの開発.....	- 19 -
2.1 ボロンジピロメテン色素を用いたセンサーの開発.....	- 20 -
2.2 蛍光ソルバトクロミック色素を用いたセンサー開発.....	- 23 -
2.3 メリフィールドレジンを用いたセンサー開発.....	- 26 -
2.3.1 メリフィールドレジン.....	- 26 -
2.4 クリックケミストリーを用いたメリフィールドレジンの活用.....	- 29 -
2.4.1 クリック反応.....	- 29 -
2.4.2 メリフィールドレジンへのクリックケミストリーの活用.....	- 29 -
2.5 蛍光ソルバトクロミック色素を用いたイオン応答型メリフィールドレジンセンサーの開発.....	- 30 -
2.6 実験項.....	- 33 -
2.6.1 試薬および機器.....	- 33 -
2.6.2 合成.....	- 34 -
2.6.3 Ca イオン応答の FT-IR 及び光導波路分光装置を用いた測定.....	- 39 -
2.6.3.1 Ca イオン水溶液への浸透から洗浄.....	- 39 -
2.6.3.2 レジンセンサーの FT-IR での変化観察.....	- 39 -
2.6.3.3 光導波路分光装置を用いた測定.....	- 39 -
2.7 結果・考察.....	- 40 -
2.7.1 レジンセンサーの合成.....	- 40 -
2.7.3 Ca イオンへの応答結果.....	- 44 -
2.7.3.1 FT-IR での測定結果.....	- 44 -
2.7.3.2 光導波路分光装置を用いた測定結果.....	- 46 -
2.8 成果と課題.....	- 48 -
第3章 ラベル化可能な蛍光ソルバトクロミック色素とアルギン酸ゲルを用いた界面活性剤 をセンシングできる化学センサーの開発.....	- 50 -
3.1 アルギン酸.....	- 51 -
3.2 蛍光ソルバトクロミック色素を用いた界面活性剤応答型アルギン酸ゲルビーズの開発....	- 52 -

3.3 比色法と画像解析	- 53 -
3.3.1 画像解析	- 53 -
3.4 実験項	- 55 -
3.4.1 試薬および機器	- 55 -
3.4.2 合成	- 56 -
3.4.3 CPC 吸着実験	- 59 -
3.4.3.1 CPC の時間依存吸着	- 59 -
3.4.3.2 ソルバトクロミズムの応答確認	- 59 -
3.4.3.3 CPC の静置吸着	- 60 -
3.4.3.4 CPC の濃度依存吸着	- 60 -
3.4.3.5 15a の性能評価	- 60 -
3.4.4 画像解析	- 62 -
3.5 結果と考察	- 63 -
3.5.1. 15 の合成結果	- 63 -
3.5.2. ソルバトクロミズムの応答確認	- 66 -
3.5.3. CPC の CPC の時間依存吸着	- 74 -
3.5.4 CPC の静置吸着	- 78 -
3.5.5. CPC の濃度依存的吸着と性能比較	- 81 -
3.5.5. CPC の濃度依存的吸着と性能比較	- 90 -
3.6 総論	- 93 -
第 4 章 結論	- 94 -
4.1 結論	- 95 -
References	- 97 -
謝辞	- 103 -
参考	- 105 -
1. NMR の測定結果	- 105 -
1.1 ¹ H NMR spectrum of 1 measured in CDCl ₃	- 105 -
1.2 ¹ H NMR spectrum of 2 measured in CDCl ₃	- 105 -
1.3 ¹ H NMR spectrum of 3 measured in CDCl ₃	- 106 -
1.4 ¹ H NMR spectrum of 4 measured in CDCl ₃	- 107 -
1.5 ¹³ C NMR spectrum of 4 measured in CDCl ₃	- 107 -
1.6 ¹ H NMR spectrum of 5 measured in CDCl ₃	- 108 -
1.7 ¹³ C NMR spectrum of 5 measured in DMSO.	- 108 -
1.8 ¹ H NMR spectrum of 6 measured in CDCl ₃	- 109 -
1.9 ¹³ C NMR spectrum of 6 measured in CDCl ₃	- 109 -
1.10 ¹ H NMR spectrum of 7 measured in CDCl ₃	- 110 -

1.11. ^1H NMR spectrum of 11 measured in CDCl_3	- 111 -
1.12. ^1H NMR spectrum of 12 measured in CDCl_3	- 112 -
1.13 ^{13}C NMR spectrum of 12 measured in CDCl_3	- 112 -
1.14. ^1H NMR spectrum of 13 measured in CDCl_3	- 113 -
2. 12 の吸光・蛍光スペクトル測定結果.....	- 114 -
2.1 12 の吸光スペクトルの測定結果.....	- 114 -
2.2 12 の蛍光スペクトルの測定結果.....	- 115 -

第 1 章 序論

1.1 「化学センサー」について

我々の生活に基づく部分で、数多くのセンサーが利用されている。センサーの分類にはその目的物を対象とする分け方と、その検出技術を中心に分ける方法の2つがある。まずは、目的物によるセンサーの分類について触れていく。

センサーは大きく分類すると次の2つがある。1つ目は物理センサーである。温度・音波・圧力・振動・光などに応答し、特定の物質やその量とは関係なく作動する。近年では、エアコンなどの家庭環境を快適に保つためのものや、家庭用ゲーム機などに用いられるジャイロセンサーなど技術の発展とともに日常生活に密接なものも増えている。2つ目が化学センサーである。ガスセンサー、イオンセンサー、バイオセンサーなど特定の化学物質に対し特異的・選択的に応答し、その量に比例した大きさの信号を出力するものである。(図1)

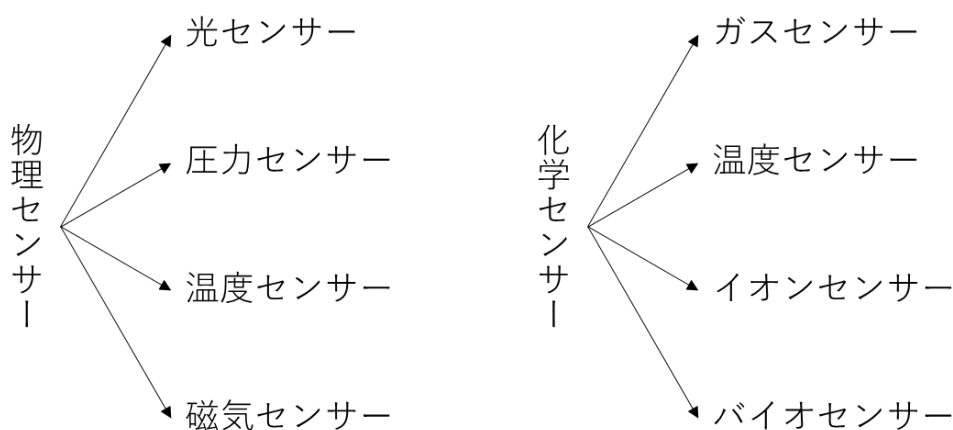


図1. 物理センサーと化学センサーの分類例

この中でも、本研究は化学センサーに着目している。先にも記載したが、センサーには使用する技術による分類もあるので、本論文と関係の深い技術について、改めて図2に示す。

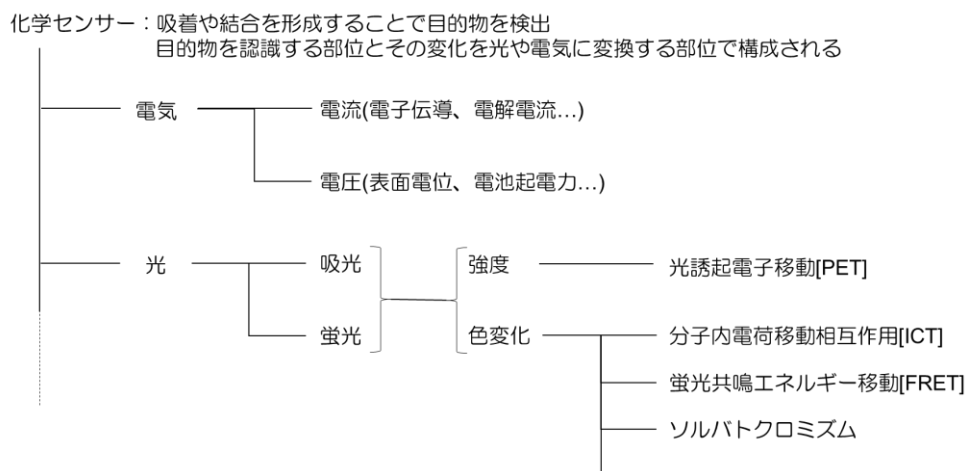


図2. 化学センサーの構造と利用される信号とその機構など

化学センサーは目的物（イオン、界面活性剤、生体物質、色素など）と特異に反応する化合物を認識部位として応答部に組み込んでいる。そして、その目的物と認識部位が反応した状態を電気や光の発光や吸収として変換するための変換部がある。最後に、人間が観測できるように出力する出力部と分かれている。変換部と出力部の間には、変換した電気信号などを増幅する増幅部と言われる部分が増えられることもある[1]。

このことから化学センサーにはイオン、界面活性剤、生体物質など目的物に特異的な応答を示す化合物に何を用いるのかと、その応答を電気や光、吸収の変化を利用して計測する部位で分けることができる。前者はイオンセンサー、生体センサーなどとそれぞれ名称がつくことが多い。一方、後者はボルタメントリーや吸光光度計、蛍光光度計、IR 測定装置などと名称がつけられることが多い。

例えば、イオン認識においては、pH ガラス電極が最初に開発されたイオンセンサーとして知られており、Haber によって発明され、Cermier がガラス薄膜を装着した電極を用いた実験により、電位が水溶液の酸性度の変化に非常に感度良く変化することを見出した[2]。この Cermier が行ったガラス薄膜を用いる電極では、図 3 のようにガラス薄膜と内部液部分で発生する水素イオンへの応答を電位差として最終的に出力することで、水溶液の pH を非常に感度良く計測することができる。

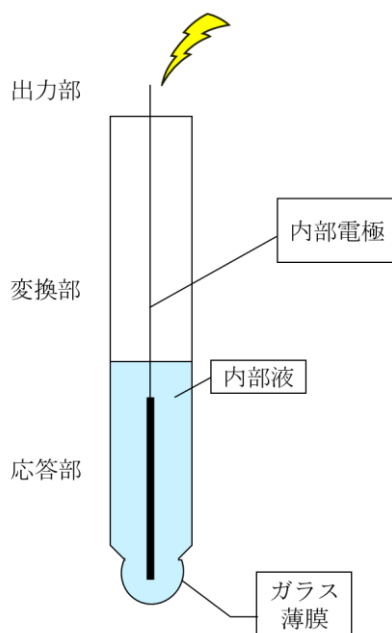


図 3. ガラス薄膜を利用したイオンセンサー

界面活性剤の認識には、陰イオン界面活性剤であればカルボキシ基などの陰イオン残基が基質に含まれる場合に静電気力を利用して補足することが出来る[3～5]。生体物質としては、例えば図 4 に示すようにアビジンとビオチンの応答が広く知られている[6]。

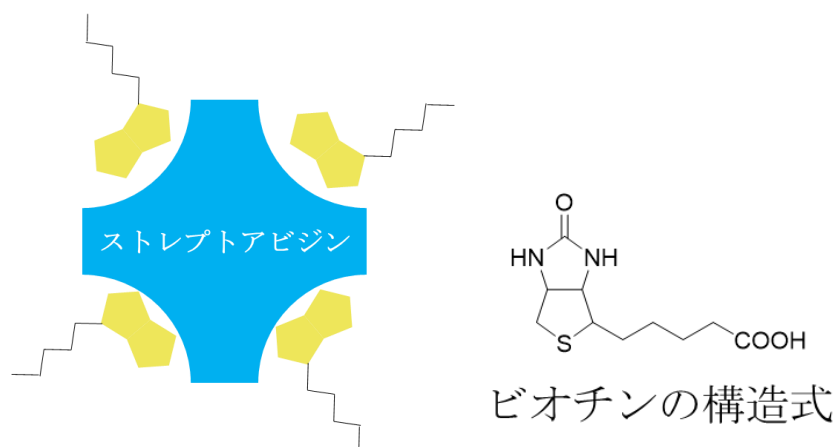


図 4. アビジン-ビオチンの応答の模式図

ストレプトアビジンは4つのモノマーからなる4量体であり、1つのストレプトアビジンに4つのビオチンが応答する。また、自然界におけるその結合能力(解離定数 $K_d \approx 10^{-15}$ mol/l)も高く評価されており、他の生体物質の目的物をビオチンで修飾し、反応を観察する手法も多く取られている[7~9]。

いずれの化学センサーにおいても、認識部位と目的物の特異性が重要であることはもちろんだが、それらを人間または機器で測定できるようにする必要がある。このためには、認識部位が利用しやすい状況にある必要がある。

このために一般的に用いられているのが固相に認識部位を固定し、その近傍に変換部を用意する手法である。固相を利用する具体的なメリットには、再利用がしやすい、ハンドリングの向上、固相上で認識部位や変換部位を合成したりすることができるなどの点が挙げられる。また、固定化には化学的吸着、共有結合、物理的吸着、高分子内に巻き込むように存在させる包括法などが知られている。固相部分には無機化合物を利用したものではシランカップリングを利用したガラス基板、チオール化合物を利用した金薄膜などが知られている。

一方で、環境負荷を考えて有機化合物を利用している固相も存在する。例えば、スチレンを主鎖として、ジビニルベンゼンを架橋剤とし、側鎖にクロロメチル基をもつスチレンを用意して作成されたメリフィールドレジンがある。メリフィールドレジンの詳細な構造や開発の歴史は次章で改めて紹介するが、これ以外にも様々な化合物が固相として利用されている。アミノ酸の共重合体であるペプチドは、元々が生態系でも利用されていることから、生体反応の追跡などをするためにも利用されている[1]。

ポリアクリルアミドは電気泳動ゲルで利用することが多く、目的物である DNA やタンパク質の電荷と分子量から、移動距離が変化する。この際に、併せて色素などを分子マーカーとして一緒に移動させることで含まれている塩基配列を決定することも可能となる。

これ以外にも、ゼラチン、アルギン酸、DNA など固相として利用されてきた。これら

の化合物は様々な規模の固相が利用されている。例えばアルギン酸については、詳細は第3章で改めて解説するが、海藻から抽出することができる2つの糖モノマーからなる糖鎖化合物である。このそれぞれの糖モノマーにはカルボキシ基が含まれており、Caイオンなどの2価金属イオンを取り込むことでナノサイズから数cmまで大きさを変更することができる。また、DNAはサケ白子などに含まれており、そのものが金属イオンを補足する能力があることが知られている。これらのポリマーでは金属イオンを補足した場合に構造が変化し、それを色素などで認識するシステムを構築することで、センサーを開発することができる。

また、これ以外にもこの利用を効率化する方法として、図5に示すように認識部位と変換部を一つにした化合物も存在する[10]。

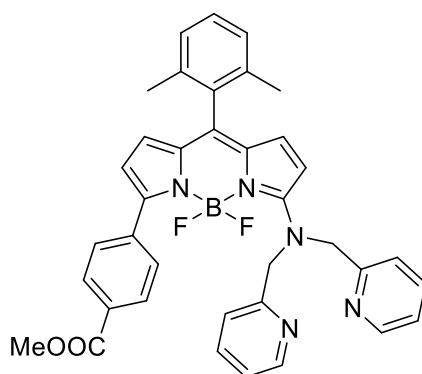


図5. 基質としてイオン認識部位が導入され変換部位としてボロンジピロメテン色素が選択された化合物

次節では、改めてこのような変換部位に吸光や発光を利用したセンサー開発について記載する。

1.2 「蛍光色素利用センサー」について

発光を利用するには、その応答する反応物となるものが電気(エレクトロクロミズム)、イオン(イオノクロミズム)、溶媒(ソルバトクロミズム)などと変化する。次項に簡単にまとめた。

1.2.1 電気(エレクトロクロミズム)センサー

図 6 に示す化合物は北海道大学の鈴木教授らにより開発された[11]。この化合物は中性状態では無色であるが、電圧を印加することにより二電子酸化が起こり、深青色のジカチオンへと変化する。

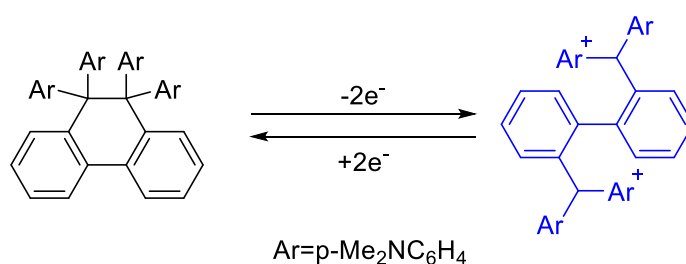


図 6. 電気センサーの開発された化合物の変化

電気による変化を用いていることで、1 分子から変化を計測することができる。このことから、より高い精度の測定を期待することができる。

1.2.2 イオン(イオノクロミズム)センサー

本節では、イオンセンサーの中でも光誘起電子移動(Photo-induced Electron Transfer ; PET)、分子内電荷移動 (Intramolecular Charge Transfer; ICT) と蛍光共鳴エネルギー移動 (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) による応答機構の 3 つを説明する。

まずは PET 機構を説明する。古くから研究が行われてきた手法であり、1977 年にクラウンエーテル型のアルカリ金属検出試薬を高木らが世界で初めて開発した比色抽出試薬であり、benzo-15-crown-5 部位にプロトン解離性の発色団を導入している[12,13]。その主な反応機構は図 7 に示すように、蛍光発色団と目的物認識部位がスパーサーを挟んで存在することと、それぞれの HOMO(Highest Occupied Molecular Orbital)-LUMO(Lowest Unoccupied Molecular Orbital)ギャップのエネルギー準位によって起こることが知られている。

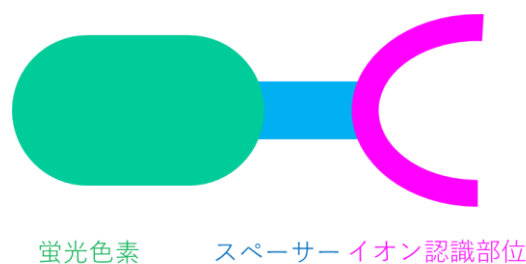


図 7. PET 型色素の模式図

具体的な応答機構としては、金属イオンを認識していない場合は図 8 の上のような変化が起こる。つまり、蛍光色素に励起光が照射されて蛍光色素の HOMO 軌道から LUMO 軌道に電子が遷移する。この際に、基に戻るよりも先にイオン認識部位の HOMO' 軌道から電子が入ることとなり、蛍光を観測することが出来ない。一方、イオンを認識した場合には、イオン認識部位の HOMO' 軌道が蛍光色素の HOMO 軌道よりもエネルギー順位が下がることにより、図 8 下側のような変化が起こる。つまり、励起光を受けた蛍光色素の電子が一つ LUMO 軌道に遷移し、そのまま HOMO 軌道に戻ることによって蛍光を観測することが出来るようになるのである。

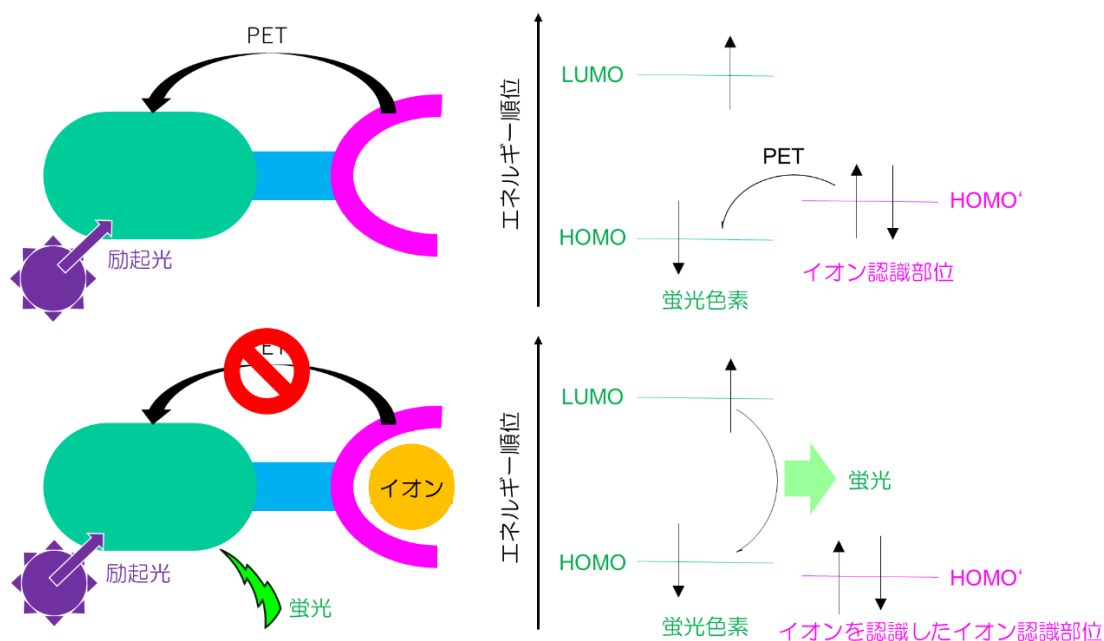


図 8. PET 機構の概念図

次に、ICT 機構の説明をする。羽深らの研究をはじめとして[10]、この 20 年間で、カリウムイオン[14,15]、銅イオン[16~18]、水銀イオン(2 価)[18]、鉛イオン[18]、亜鉛イオン[19]などに応答するイオンセンサーが多数報告されている。本節では、カルシウムイオン応答型蛍光色素 fura-2 を基にその応答機構を解説する[20]。

前節でも示したが、イオン認識部位が導入された fura-2 は、カルシウムイオンが含まれていない場合にはイオン認識部位からの分子内電荷移動相互作用の影響で HOMO-LUMO ギャップが小さくなる。一方、イオン認識部位に金属イオンが含まれる場合には、分子内電荷移動相互作用がキャンセルされることで HOMO が大きく不安定化するが、LUMO はそれほど大きく変化しないことから HOMO-LUMO の間のギャップが大きくなり、イオンを認識した場合には励起光が短波長にシフトする。(図 9)

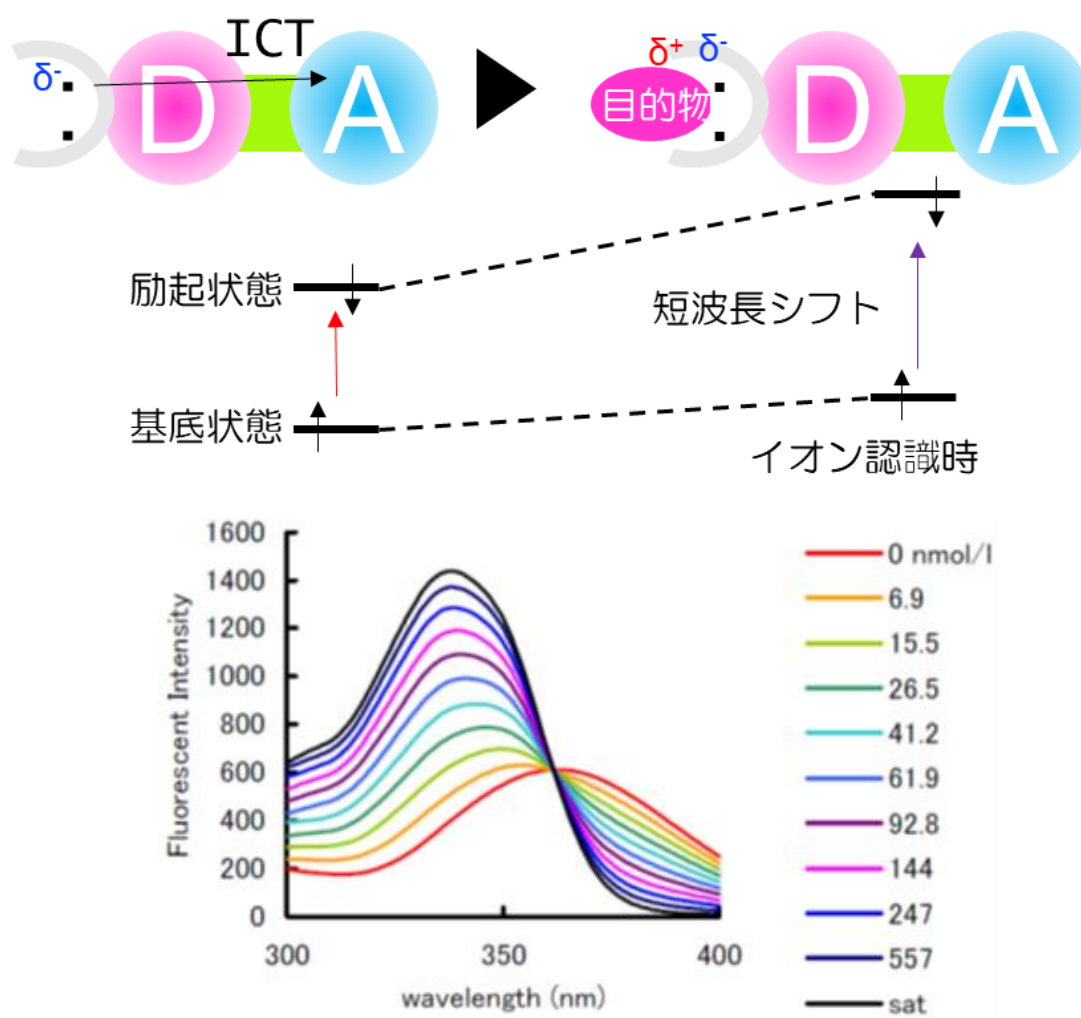


図 9. 励起波長と分子内電荷移動 (Intramolecular Charge Transfer; ICT) 作用と fura-2 の吸収波長の変化[21]

fura-2 の構造は図 10 に示すように、蛍光色素に BAPTA-AM を導入したような構造をしている。BAPTA-AM は BAPTA のカルボキシル基をすべてアセトキシメチルエステル化したもので、電子供与性部位としての役目と Ca イオンと応答するための部位としての 2 つの役割を持っている。しかし、この部位導入には 2 つの問題点がある。1 つ目が、こ

のような応答部位を導入しても反応するか予測が付きにくいことである。2つ目が、そもそもの合成難易度が上がることである。合成には10ステップ必要となり、導入までに時間がかかってしまう。

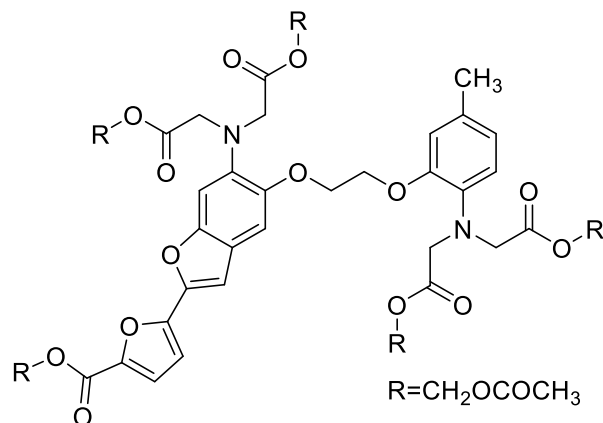
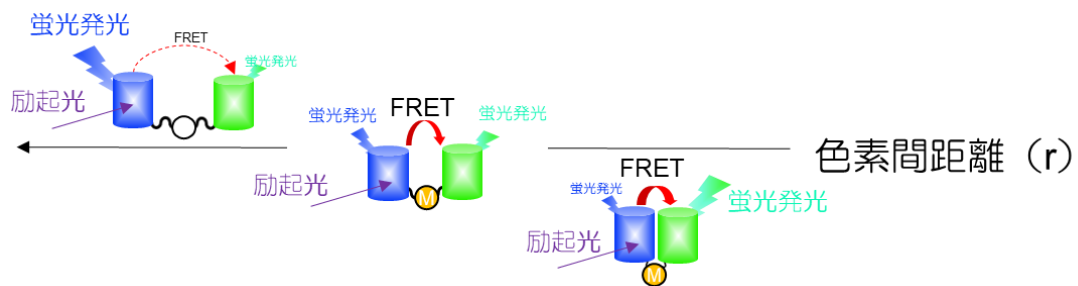


図 10. fura-2 の構造

最後に、FRET 機構について解説する。Theodor Förster が開発した技術であり、現在ではタンパク質の構造変化の計測に加えて、一塩基多型 (SNPs) の検出、定量 PCR などに応用されている。ここでは、生態系に利用できるイオンセンサーを開発した前島らの研究を基に説明する [22]。一般的に、吸光などにより励起状態になった蛍光色素 (ドナー蛍光色素) は、蛍光を発するか、あるいは振動緩和や項間交差を経て基底状態に戻る。ただし、この際にフェルスター距離にそのドナー蛍光色素が発生した蛍光を吸収することができる蛍光色素 (アクセプター蛍光色素) がある場合は、そのアクセプター蛍光色素によるエネルギー放出で基底状態に戻る過程が加わる。(図 11)



0 エネルギー効率: $E \propto \left(\frac{1}{r}\right)^6$ 100

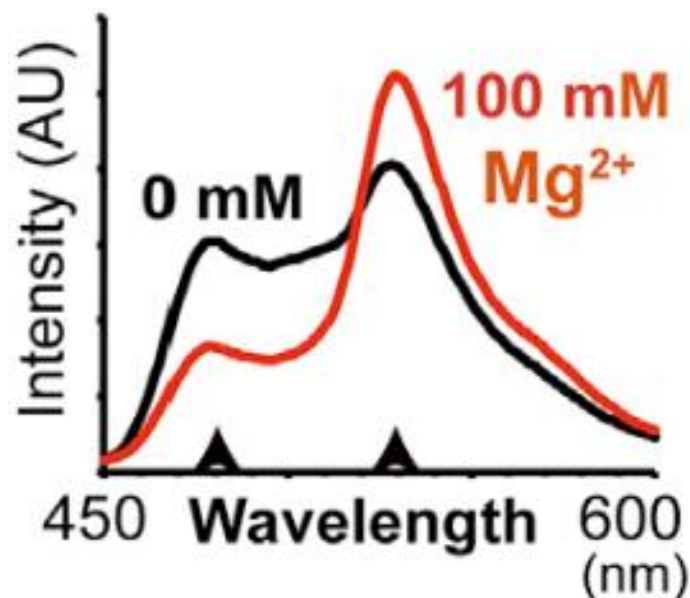
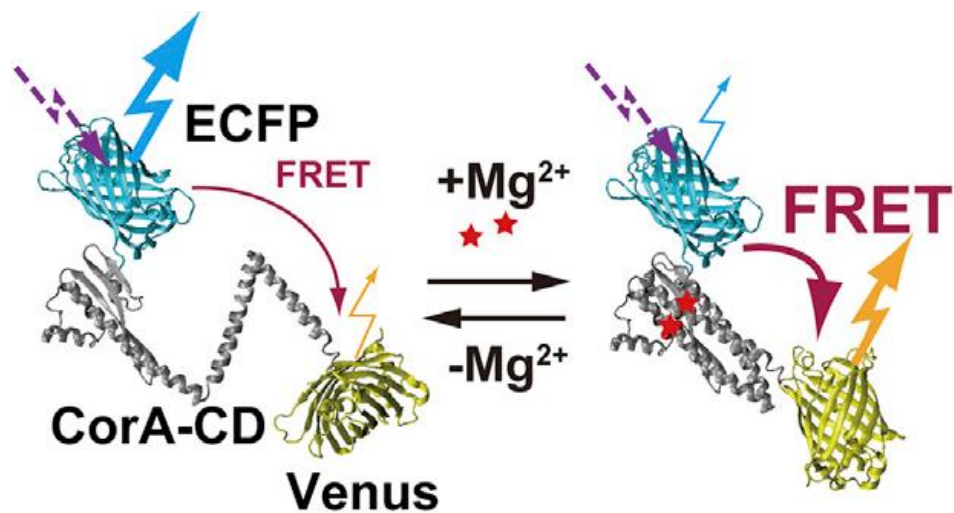


図 11. FERT 機構と Mg イオン応答型高感度センサー MARIO (Magnesium Ratiometric Indicator for Optical imaging) と MARIO が Mg イオンに応答した反応結果([22]より)

この時、アクセプター蛍光色素が発する蛍光波長はドナー蛍光色素が発する蛍光波長よりもレッドシフトすることが一般的に知られている。FRET 機構を利用した化学センサーは MARIO 以外にも蛍光のあるタンパク質同士を組み合わせることでその相互作用を確認することが出来ることなども知られている。しかし、この距離によって蛍光強度が変わってしまう性質から、変化をコントロールするのが難しい、近すぎると会合体を精製して自己消光してしまうため、MARIO のようにイオンを捕まえることで形状変化して蛍光色が変わるように分子設計するのは合成が難しいという問題点が挙げられる。

1.2.3 溶媒(ソルバトクロミズム)センサー

蛍光ソルバトクロミック色素は、色素周囲の溶媒極性によって蛍光波長が大きく変化する一方、吸収波長はほとんど変化しないので単一光源で定量的に検出するインジケーターとして好都合である。その構造は電子供与性部位、共役系拡張のための π 電子部位、電子求引性部位から構成される。これらの事から親油性が高い構造をしていることが多い。一般的に知られている幾つかの蛍光ソルバトクロミック色素の構造を図 12 に示す。

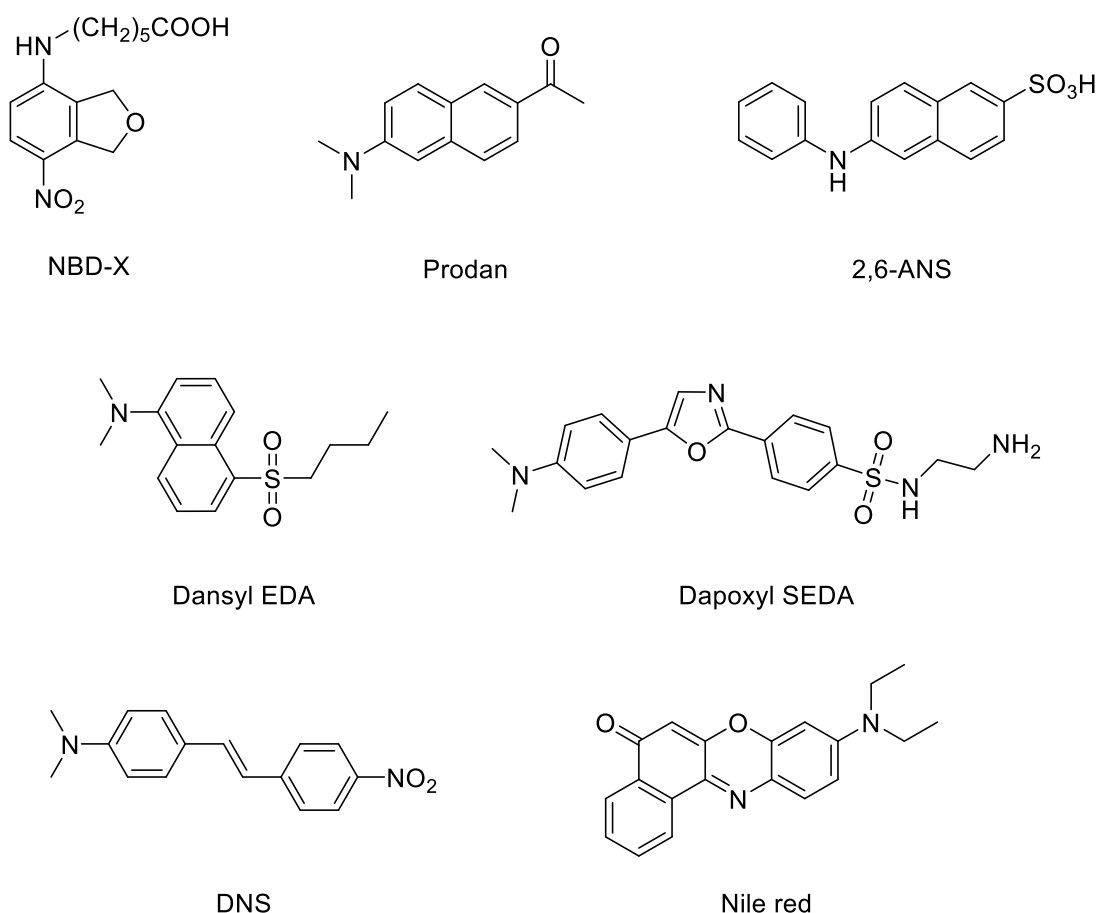


図 12. 代表的な蛍光ソルバトクロミック色素の分子構造

さらに、分子量がタンパク質などと比較して小さいものが多いため、生体反応において目的タンパク質の働きを知るために修飾しても影響が出にくいということから、抗原-抗体反応、DNA のらせん構造の形成、脂質膜ダイナミクスなど極性環境の変化を伴うことを加味して利用されるものが多く、既に蛍光溶バトクロミック色素を用いて定量的に検出する研究が行われている。ここでは、Nile red を例に溶バトクロミズムの仕組みとその活用含めて紹介する [23]。まず、溶バトクロミズムの仕組みを図示すると、図 13 のようになる。

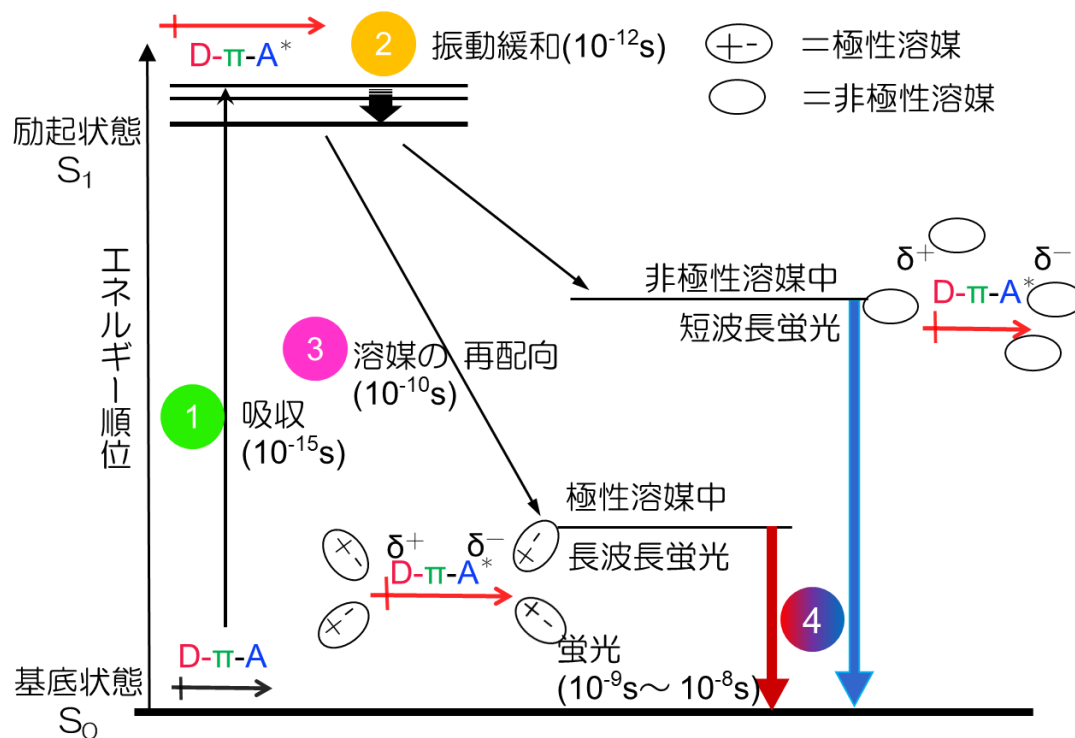


図 13. 蛍光溶バトクロミック色素の機構概念図

これは、①励起光を照射されると基底一重項状態 (S_0) にあった蛍光溶バトクロミック色素の分子内の電荷分離が大きくなり、双極子モーメントが増大しながら励起状態となる。②励起状態となった色素の中では励起状態の中でも安定した状態である最低励起一重項状態 (S_1) に振動緩和しながら落ちる。③その際に、周囲に極性溶媒があれば溶媒が大きく分極した双極子モーメントを保存ように溶媒配向し、通常の S_1 よりも大きく安定化するエネルギー順位に落ち着く。一方、非極性溶媒が存在する場合にはそのような安定化が起こりにくく、分極した双極子モーメントが小さくなったエネルギー順位に落ち着く。④この後、それぞれの場合で残りのエネルギーを光として放出することで蛍光発光を観測できる。このような性質を利用することで、Nile red は図 14 のような変化を示す。

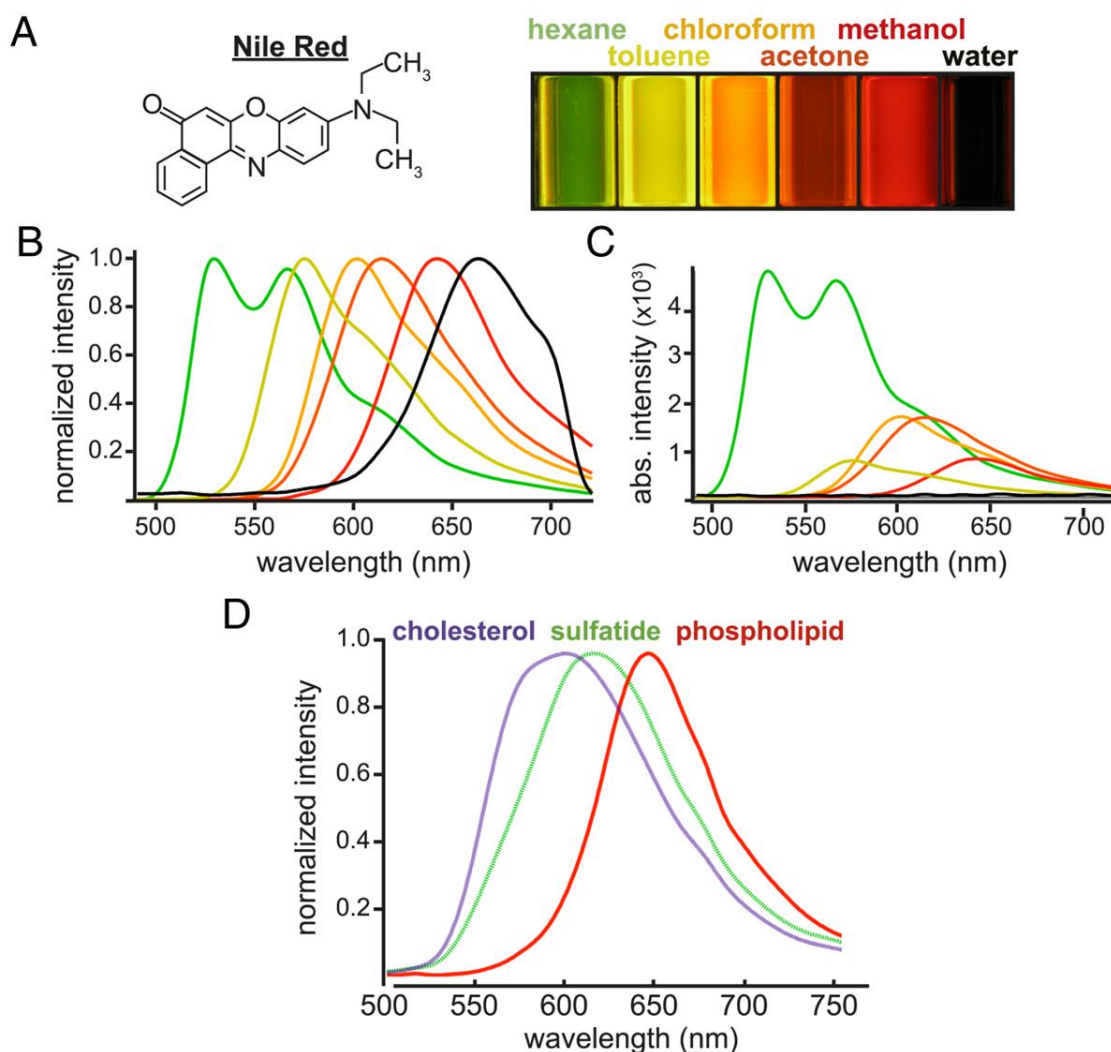


図 14. Nile red の分子構造とその蛍光色変化 (A) Nile red の分子構造とヘキサン、トルエン、クロロホルム、アセトン、メタノール、水の溶媒中での蛍光色変化、B) ノーマライズした各溶媒での蛍光スペクトル測定結果、C) ノーマライズしていない場合の蛍光スペクトル測定結果、D) リン酸緩衝生理食塩水 [PBS] の溶液中 (0.25 M) 中のコレステロール、スルファチド、リン脂質を加えた場合の蛍光スペクトル測定結果) [23]

蛍光溶バトクロミック色素の強みは、この「周囲の極性に応じて蛍光色が変わる」ことである。極性を変化させるのは溶媒でなくても金属イオンなどの化合物でも可能であるため、金属イオンを含むと蛍光色が含まない場合に比べて長波長化する。さらに、蛍光色自体が変化するために別の色素をフェルスター距離に準備する必要もない。これらのことから、ICT 機構や FRET 機構よりも手軽に利用しやすい機構となっている。こういった背景から、本研究では蛍光溶バトクロミック色素を主体とした研究を行う事とした。

1.3 本論文の研究目的

前節までに記したように、蛍光色素を利用した化学センサーは幅広い場面で利用されている。しかし、芳香族部位を含むことで π 電子共役系が分子内に多く存在することから、親油性が高い分子構造をしている。このため、多くの蛍光色素は有機溶媒中には安定的に溶解して存在することができるが、水中では溶解性の問題から利用できないことが多い。

そこで、本研究の目的は、前節でも紹介したメリフィールドレジンやアルギン酸ゲルを固相として、蛍光ソルバトクロミック色素を修飾した化学センサーの開発を行うことと設定した。つまり、固液界面上において利用可能なセンシングシステムの開発を考えた。(図 15)

また、このことから、蛍光ソルバトクロミック色素は固相への固定が容易にできるようなラベル化部位を持つものを開発することを目指す。



図 15. 水中でも蛍光発光を利用できる化学センサー開発の予想図

第 2 章

クリック反応に利用可能な新規エチニル基
導入ソルバトクロミック色素とメリフィー
ルドレジンをを用いた Ca イオンセンサーの
開発

2.1 ボロンジピロメテン色素を用いたセンサーの開発

前章でも触れたが、第 2 章の目的を説明するために、修士課程で行ったボロンジピロメテン色素を用いた固相固定用センサー開発について触れる。

まず 4,4- difluoro-3a,4a- diaza-s-indacene (Boron dipyrromethene, 通称 BODIPY)は図 16 に示す構造を持つ。

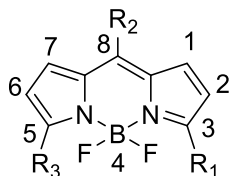


図 16. Boron dipyrromethene (BODIPY) core

BODIPY は高いモル吸光係数($\epsilon > 80,000\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$)、量子収率(水中ですらほぼ 1 に近い)を持つ、化学反応、熱に対し安定である、比較的狭い発光バンドを持つ、可視光領域に吸収及び蛍光波長(500nm~750nm)を持つ、といった優れた光学物性を持つ[23]。

また、3 あるいは 5-位は置換基の導入によって ICT 効果を起こすことがわかっており、3-位に認識部位を持つ BODIPY 誘導体は目的物との結合によって電子供与性が変化し、蛍光波長が変化する。すなわち、3-位に認識部位を持つ BODIPY 誘導体は蛍光波長の変化する波長変化型のインジケーターとして利用できる。(図 17)

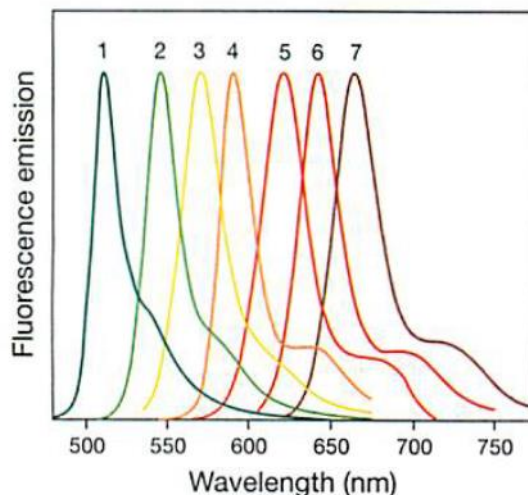


図 17. メタノール中でのノーマライズしたいくつかの BODIPY の蛍光スペクトル[23]

(1)BODIPY FL、2)BODIPY R6G、3)BODIPY TMR、4)BODIPY 581/591、
5)BODIPY TR、6)BODIPY 630/650、7)BODIPY 650/665)

第 1 章の 1.2.2 でも触れたが、ボロンジピロメテン色素をイオンセンサーとして利用する

ために芳香族求核置換反応を用いてイオン認識部位の導入する方法が用いられていた。そこで、ボロンジピロメテンジクロリドを原料として、最初の片側の塩素末端への導入する置換基を波長調整が可能で、芳香族求核置換反応のカルボアニオン中間体を安定化させる置換基に変更すれば、更に応用範囲が広がると考えた。

このため、置換基による反応性への影響が少なく、BODIPY の波長調整に有効なさまざまな芳香環を導入できる鈴木 - 宮浦クロスカップリングの併用を計画した。5-位に電子求引性アリール基を直結させ、3-位に 1 級または 2 級アミンを、芳香族求核置換反応をもって認識部位として導入し、より高収率かつ短時間で反応が進む合成法の研究を行った。(図 18)

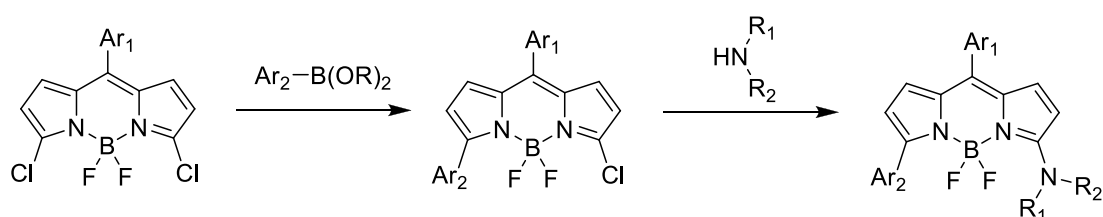


図 18. ボロンジピロメテンジクロリドに対する反応

そして、水溶性が乏しい BODIPY インジケーターに対して、その問題を回避するために 8-位にガラス基板などに固定化できる部位をもつインジケーターの開発を行った。(図 19)

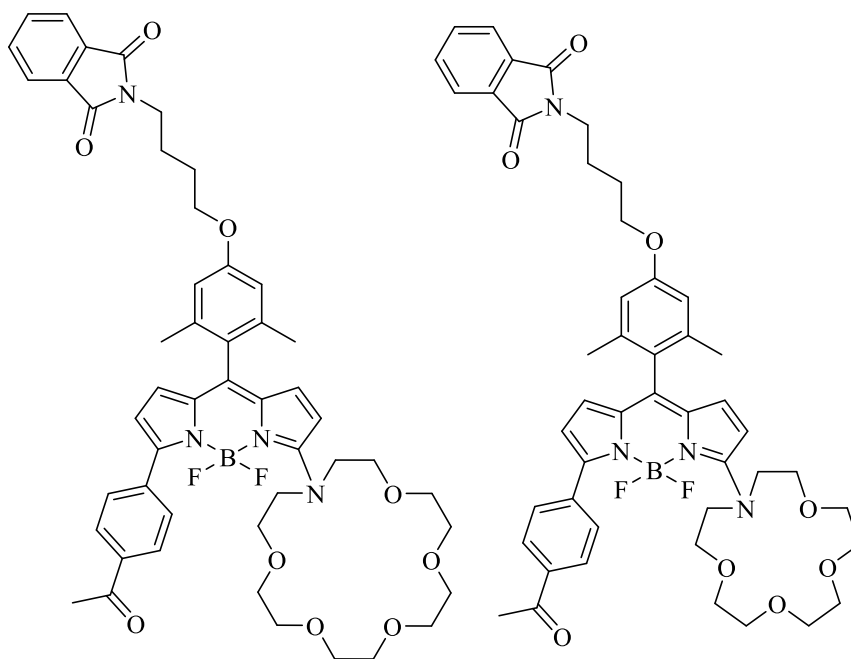


図 19. 本研究で合成した 8-位に固定化部位を持つインジケーター

(左 : Ca イオンへの応答を目的とする、右 : K イオンへの応答を目的とする)

これらの化合物の分子設計は、次のように考えた。

まず、8-位に導入されているフタルイミド基を含む部分は、ボロンジピロメテン色素の合成ルートに耐えうる強固なアミノ末端として選択した。また、ジメチルフェニル基の部分は固定化部位の延長とフェニル基がフリーに回転してしまうのを避けるために導入した。ここがフリーに回転してしまうと蛍光発光する際の蛍光量子収率が低下すると考えた。さらに、これらの部位を導入した上で、鈴木-宮浦クロスカップリングと芳香族求核置換反応を併用したのちに、最終的にはラベル化部位として用いているフタルイミド基を脱保護し、アミノ末端を露出させる。そして、ガラス基板などにこれらのイオン認識部位が含まれているボロンジピロメテン色素を固定することで、インジケーターの役割を果たせると考えた。(図 20)

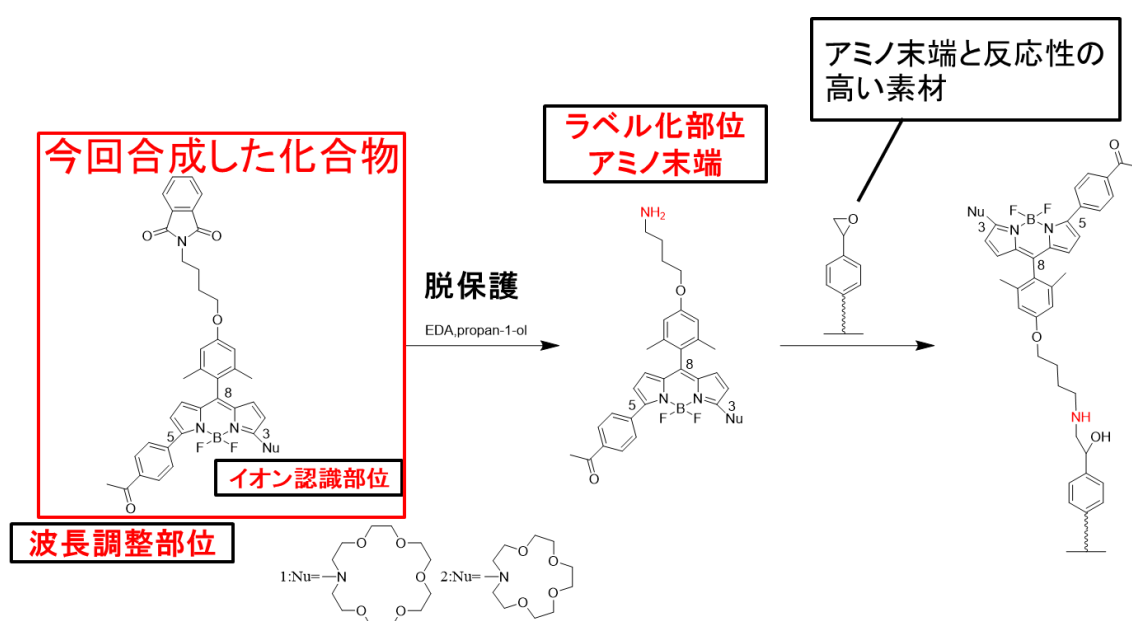


図 20. 本研究で合成した 8-位に固定化部位を持つインジケーターの固相への固定

この研究の結果としては、ジクロロメタン溶液中では Ca イオンへの応答を蛍光色変化として観測することはできた。

しかし、本来の目的とする固相への固定を達成することは出来ていなかった。この理由としては、固相への固定部位として保護基に用いていたフタルイミド基の脱保護を実施しようとしたところ、イオン認識部位であるアザクラウンが同時に破壊され、NMR 上で観測できなくなるとともに、Ca イオンへの応答を示さなくなってしまったためである。

より、利用しやすい固定部を模索することも考えたが、ボロンジピロメテン色素を合成する際には強酸性から強塩基性まで pH が大きく変化することや温度も -78°C~120°C まで変化するなど厳しい反応条件が多いことから、断念することとなった。

2.2 蛍光ソルバトクロミック色素を用いたセンサー開発

この知見を基に、本項では当研究室で研究を行っているもう一つの色素、蛍光ソルバトクロミック色素に着目することとした。

Son らは蛍光ソルバトクロミック色素の構成部位である電子ドナー部位としてジヘキシルアニリン、蛍光色素母骨格部位としてチオフェン、電子アクセプター部位としてピリジン塩を別々に合成し、最後にこれらを鈴木宮浦クロスカップリングにより直結することで、脂質二分子膜観察用蛍光ソルバトクロミック色素の合成とその評価を行った[24]。

この手法の優れた点として、鈴木-宮浦クロスカップリングを利用することで蛍光ソルバトクロミック色素の構成部位を事前に合成し、合成効率を上げることが出来た。(図 21)

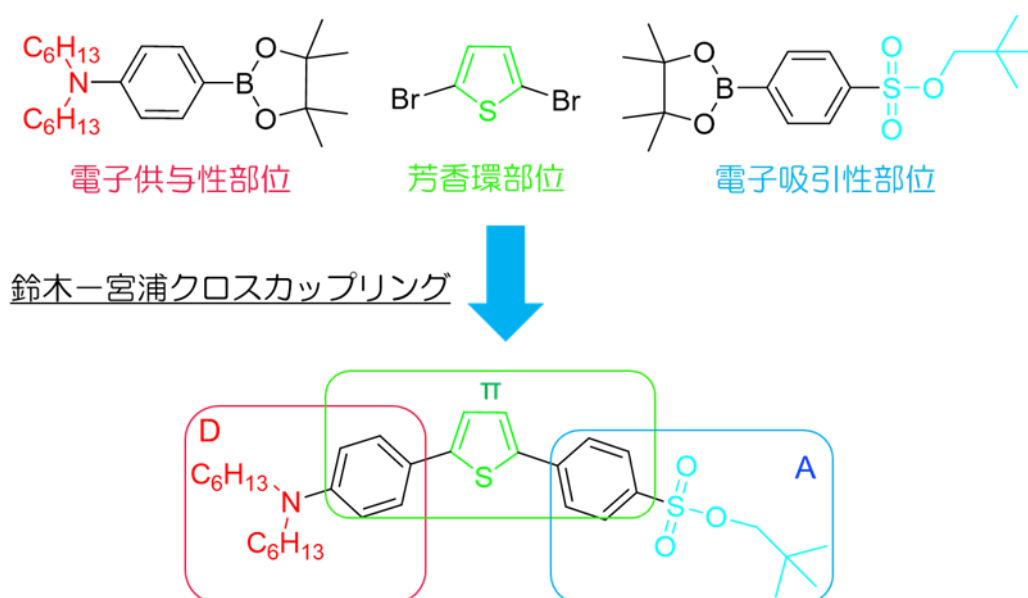


図 21. Son らが開発した蛍光ソルバトクロミック色素の分子構造とワンポット合成法

実際、当研究室では図 22 に示すような様々な蛍光ソルバトクロミック色素が開発されてきた。

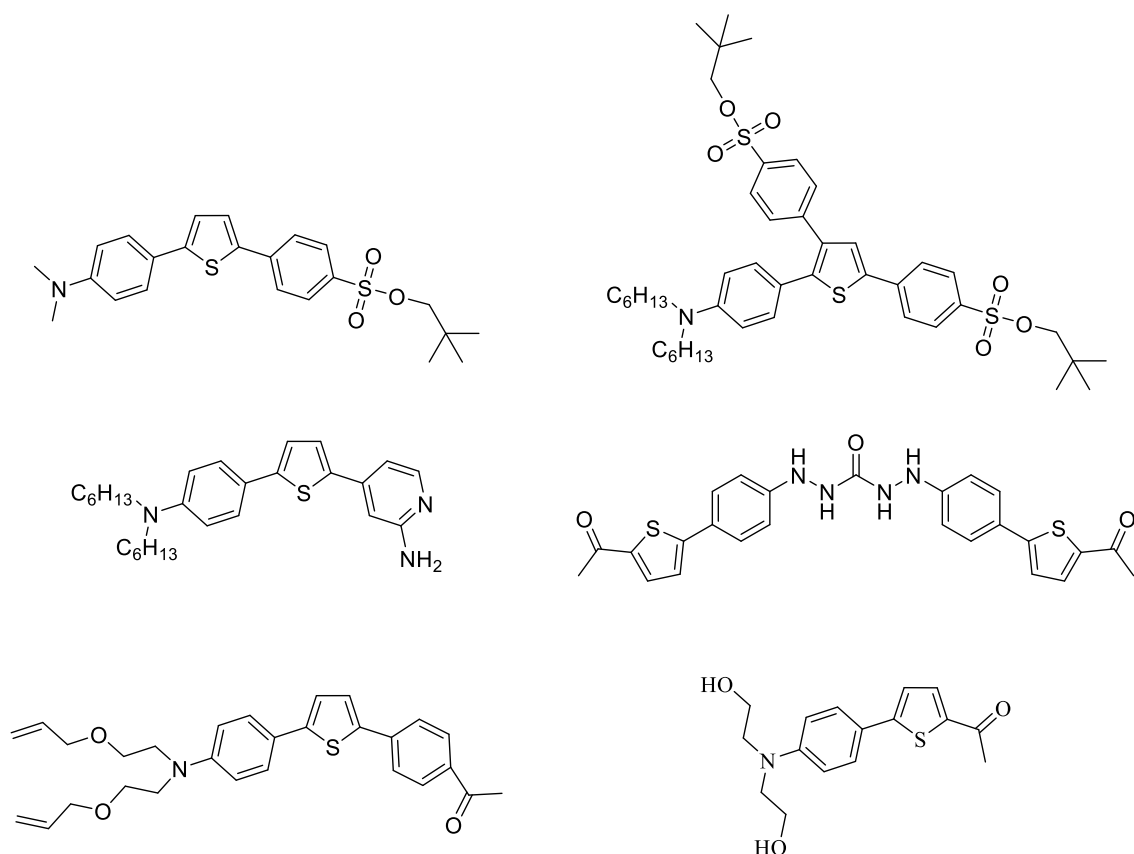


図 22. 当研究室で研究されてきた蛍光ソルバトクロミック色素の構造式
 (左上：Son による研究、右上：櫻井による研究、左中段：岩本による研究、
 右中段：Liu による研究、左下：近田による研究、右下：岩館による研究)

この図 22 の中でも、左下及び右下に示される近田や岩館の研究は、有機溶媒中で蛍光ソルバトクロミックを示す色素を固相に固定する、あるいはポリマーの中に組み込んで利用することを想定していた。

ここでは、例えば近田らが合成した化合物の分子設計と検討していた利用方法を具体的に示す。近田はビニル基をもつ蛍光ソルバトクロミック色素を合成し、ビニル系モノマーとラジカル共重合をさせることを試みた。実際に用いたビニル系モノマーは、酢酸ビニルモノマーであった。この理由としては、酢酸ビニルモノマーから重合によって得られるポリ酢酸ビニルは、けん化によりポリビニルアルコールとなることで極性が大きくなり、さらにアセタール化によりベニロンとなり極性が小さくなる性質をもつ。これらの変化について蛍光ソルバトクロミック色素を用いて追跡できる可能性があると考えたからであった (図 23)。

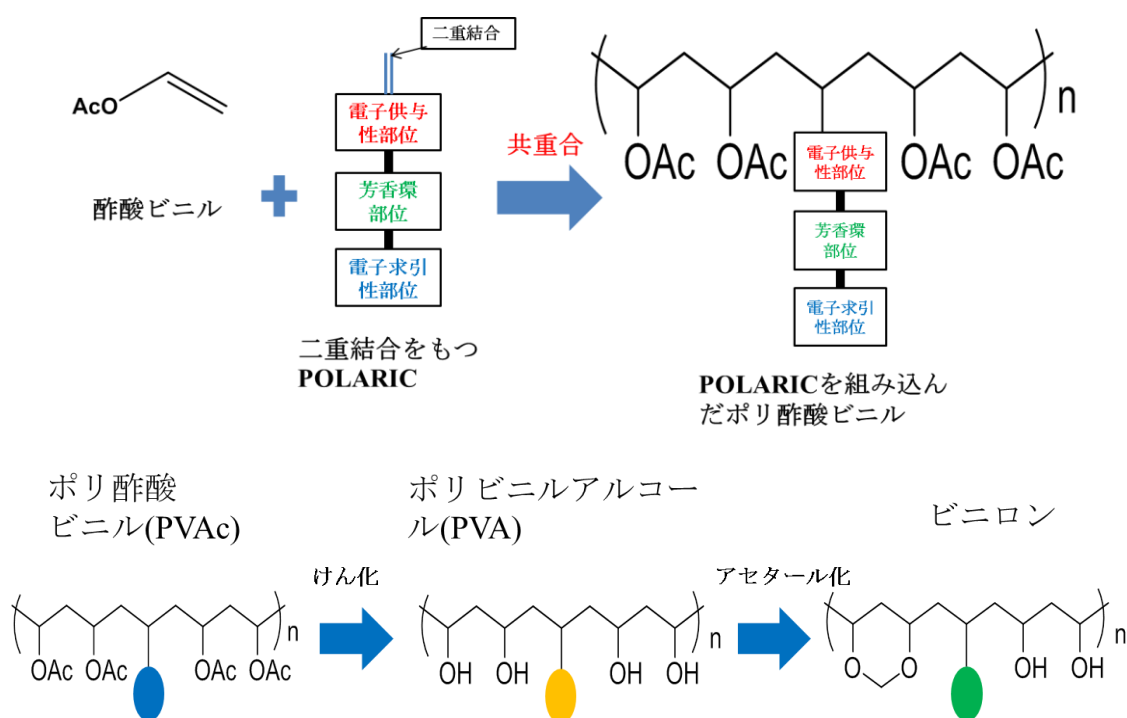


図 23. ビニル基を導入した蛍光溶バトクロミック色素を用いて実施するポリ酢酸ビニル系の変化の追跡予想図

しかしながら、近田が分子設計した蛍光溶バトクロミック色素には二重結合が 2 つ含まれていたため、共重合させた際に複雑な網目構造となり、色素の入っていない元のポリマーと溶解性や物理的特性が異なる材料が得られた。さらに、実際にできた化合物は水中でも利用できるようなものではなかった。

そこで、以下では化学反応を用いて固相へ固定することにより、これら蛍光溶バトクロミック色素を用いた化学センサーの開発を目指した。次節以降では、そのために選択したメリフィールドレジジンとクリック反応について記す。

2.3 メリフィールドレジンをを用いたセンサー開発

2.3.1 メリフィールドレジン

最初に、これまでに広く用いられてきた実績や、大塚らの知見を応用できる利点を持つことから、メリフィールドレジンに着目した。メリフィールドレジンは 1959 年に R.B.Merrifield によってペプチド合成の効果的な手法として報告された際に、使用されたポリスチレンを主体としたポリマーである[25]。このポリマーの中にはクロロメチル基が導入されており、ジビニルベンゼンを架橋剤として用いている（図 24）。

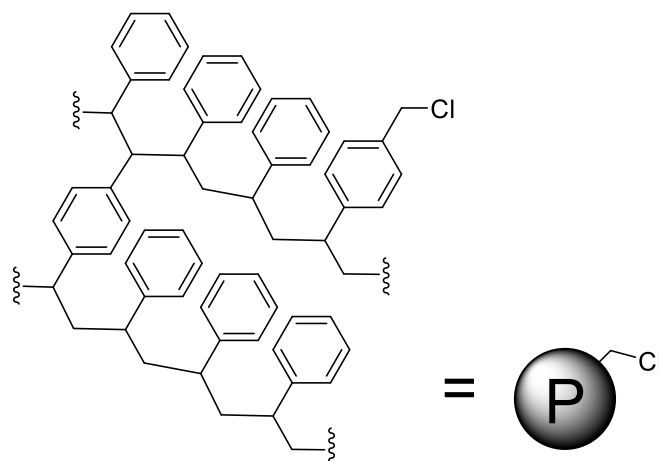


図 24.メリフィールドレジンの概略図

元々、Merrifield は血圧抑制に関わるオクタペプチドホルモンのイムノアッセイ法を開発するため、部分抗体又は抗体の合成を試みた[26]。しかし、液相におけるペプチドの合成では原料や反応物の物性が似通っており、クロマトグラフィーによる精製が困難である。目的とするペプチド化合物は多段階の反応を行ってから得られる化合物のため、液相合成では十分な純度の目的物を一定量得ることは難しいという問題が発生した。

そこで、Merrifield は固相合成法という手法を用いることとした。この方法は、小さなポリスチレンビーズの結合させるための導入部（メリフィールドレジンではクロロ基）にアミノ酸を結合させる。続けて反対側の末端に目的とするペプチドを順番に縮合反応させる。この際に、反応させない側の末端は保護しておく。この保護基を脱保護し、縮合と脱保護を繰り返すことによって、目的とするペプチドの配列を作り出す。最後に、出来上がったペプチドを固相表面から切り出し、目的の化合物を得るという手法である。固相合成法は用いる固相に基質分子が固定されているため、反応ごとに固相の洗浄によって樹脂上にある目的物を容易に精製することが可能である(図 25.)。

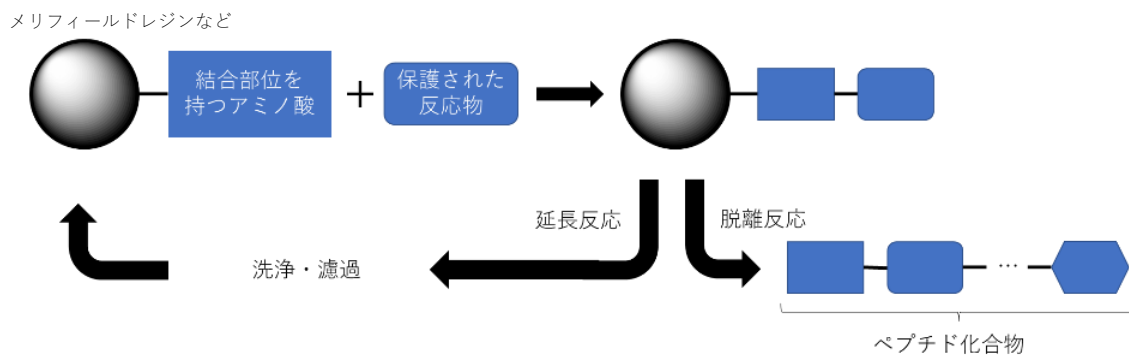


図 25. 固相合成法の実用例

また、これ以外にもペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端を直接結合することができるよう改良された図 26 のようなレジジンも固相合成に利用されている。

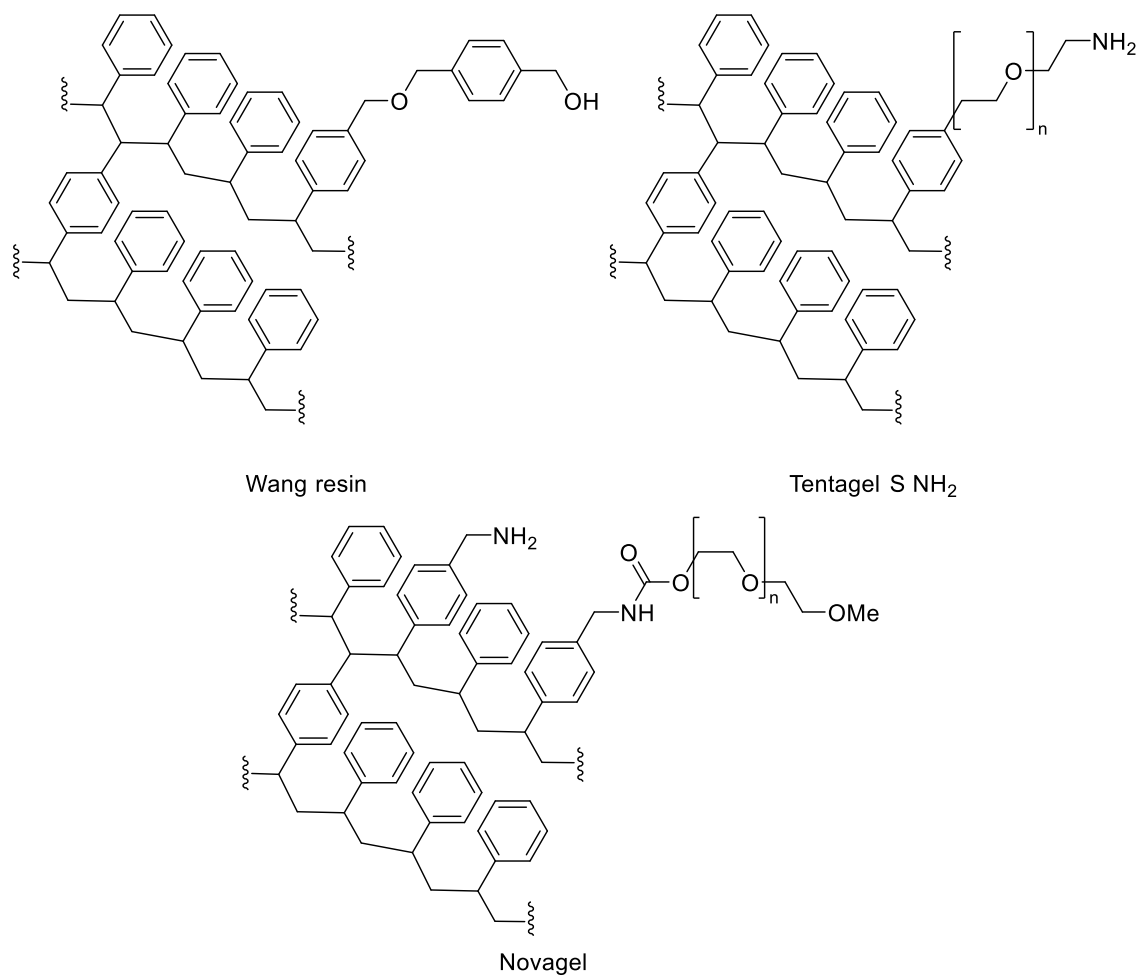


図 26. そのほかに用いられるポリスチレンを主鎖にしている固相合成用レジジン

しかし、最近では固相合成用のレジンの新たな反応を利用した活用が広がっているため、次節ではその例として、クリックケミストリーとの関係を記す。

2.4 クリックケミストリーを用いたメリフィールドレジンの活用

2.4.1 クリック反応

有機化学分野においては、目的の化合物を得るため数多くの反応、精製、分析を繰り返して目的物を得ている。反応性が悪いと目的物の収率が下がる。試薬の取り扱いや生成物の分離精製が困難であることが多い。さらに、途中生成物や目的物が分解性や反応性が高いことで安定に保存できないなどの問題があることが知られている。

クリック反応とは、反応させる際にその選択性がとても高いことから副生成物が生成されにくく、安定した収率で目的物を得ることができる。また、反応が高い選択性を持つことから反応物と目的物の溶解性が変化するように分子設計することで容易に分離できるようなにもできる。さらに、有機溶媒中だけでなく水中などの生理的な条件のどちらにおいても反応させることができる。これらの特徴から先ほど記載した課題解決につながる反応が多いことから、近年、数多くの研究者がその開発に取り組んでいる。

例えば、2022 年のノーベル化学賞を受賞した Sharpless らはアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 内で、2 つの阻害剤をクリックケミストリーの手法で架橋させた。その結果、新たな AChE 阻害剤を発見することに成功した[27]。また、クリックケミストリーにはカルボニル化合物とヘテロ原子を有する化合物との縮合反応、エポキシドやアジリジンに対するヘテロ原子求核剤による開環反応も知られている。

2.4.2 メリフィールドレジンへのクリックケミストリーの活用

メリフィールドレジンに良く用いられるクリックケミストリーとしては、銅触媒を用いたアセチレンとアジドとの Huisgen 型 1,3-dipole 付加環化反応によるトリアゾール生成反応が知られている[27]。この反応では、主に爆発性の高いアジド化合物をメリフィールドレジンの担当させることで、安全に目的化合物を得られることができる[28~33]。

さらに、新たな利用方法としてイオン補足部位をアセチレンとアジドとの Huisgen 型 1,3-dipole 付加環化反応によるトリアゾール生成反応で導入することで、そのトリアゾール環と併せて複数の金属イオン種から特定の金属イオンを抽出する方法が開発された[34]。この Abid らの研究では、幾つかの金属イオンと錯形成することが知られている化合物をクリック反応でメリフィールドレジンに結合させ、金属イオンを選択的に補足できるか調査している。特に、この中では N-prop-2-ynylacetamide をアセチレン化合物として用いることで、カドミウムを選択的に抽出することができたと報告されている。

2.5 蛍光ソルバトクロミック色素を用いたイオン応答型メリフィールドレジンスセンサーの開発

第1章でも触れたが、蛍光ソルバトクロミック色素はその分子周囲の溶媒極性によって蛍光波長が変化する機能性分子である。つまり、極性変化を伴う分子間相互作用を蛍光波長で識別できる優れたインジケーターになる可能性がある[24]。

この分子間相互作用に着目すると、前節で触れた金属イオン認識部位はイオンを認識する際に分子内電荷の変化が起こるとともに、周囲へ与える影響も変化することが考えられる。そこで、本研究では Click 反応に利用可能な蛍光ソルバトクロミック色素 **6** を設計した。蛍光ソルバトクロミック色素 **6** は電子求引基としてアセチル基、芳香環としてチオフェン、電子供与基および ethynyl 末端へのリンカーとしてピペラジンを持つ。また、金属イオンを認識するアセトアミド基を持つエチニル誘導体 **7** も併せて合成することとした。(図 27)

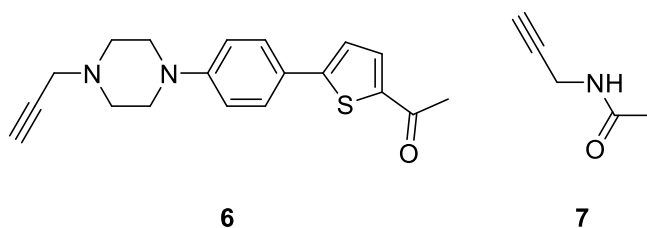
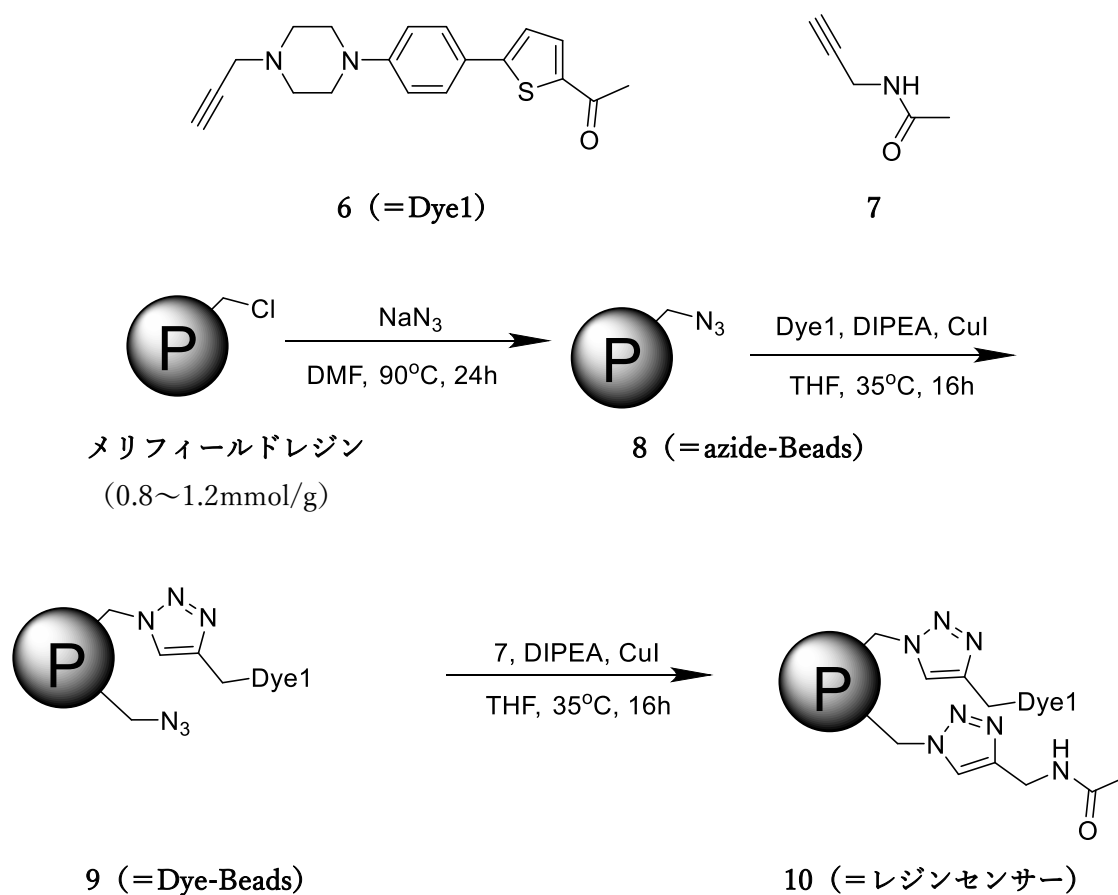


図 27.本研究で新規合成したラベル化部位としてエチニル基を持つ蛍光ソルバトクロミック色素とイオン認識部位のアセトアミドを持つエチニル化合物

これらの分子をアジド化されたメリフィールドレジンに順次固定すると、通常の蛍光色素を Click 反応でラベル化したものと異なり、認識部位を蛍光色素内分子に直結しなくても認識部位の極性が金属イオンを認識することで変化すると、分子間相互作用によって蛍光ソルバトクロミック色素 **6** の蛍光発光が変化して金属イオンを認識できるレジンスセンサーの開発が可能であると考えた。(スキーム 1.)



スキーム 1. 蛍光ソルバトクロミック色素 **6** と金属イオン認識部位 **7** のメリフィールドレジジンへの固定

これらの蛍光ソルバトクロミック色素導入メリフィールドレジンセンサーの応答機構については、図 28.にまとめた。具体的には、**9 (=Dye-Beads)** では励起光が照射されるとまず導入されている蛍光ソルバトクロミック色素 **6** が励起状態になる。その後、周囲の溶媒によって溶媒和が発生し、蛍光が発生する。それに対して、**10 (=レジンセンサー)** では金属イオンを認識部位が補足しているかないかで蛍光が長波長シフトすると考えた。

つまり、金属イオンを認識していない場合には、蛍光ソルバトクロミック色素の近傍に存在する金属イオン認識部位と周囲の溶媒の両方から配位を受けることで、ただ溶媒が周囲に存在するよりもより大きく長波長シフトすることが考えられる。

一方、金属イオンが存在する場合には、金属イオン認識部位の蛍光ソルバトクロミック色素への配位する影響力が減少することで、長波長シフトが少なくなる、つまり、金属イオン認識部位が金属イオンを補足している場合よりも短波長シフトすると考えた。

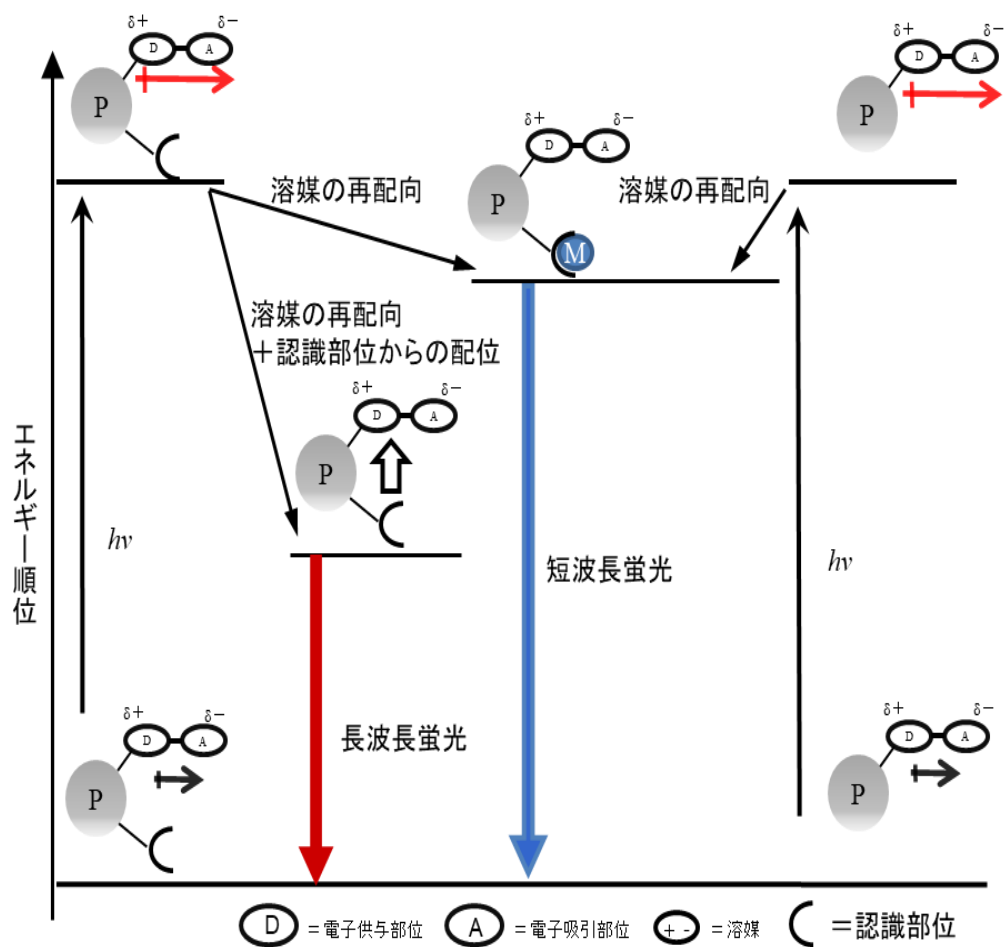


図 28. 蛍光溶バトクロミック色素導入メリフィールドレジンへの金属イオン認識部位が及ぼす影響についての予測図

以降の節では、この蛍光溶バトクロミック色素導入メリフィールドレジンセンサー（以降、レジンセンサーとする）の性能の評価に関する実験方法とその結果、考察について記載する。

2.6 実験項

2.6.1 試薬および機器

すべての試薬は富士フィルム和光純薬工業株式会社から購入しそのまま使用した。

合成反応は薄層クロマトグラフィー 60F₂₅₄ (layer thickness, 0.25 mm; E. Merck, Darmstadt, Germany)によって反応の進行を確認した。目的化合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製に使用したシリカゲルは Wakosil® C-300 (0.04–0.06 mm,富士フィルム和光純薬株式会社)を用いた。

核磁気共鳴(NMR)スペクトルは、日本電子株式会社(東京)製の JNM-EX400 を用いて記録し、テトラメチルシラン(TMS)を基準とした。

精密質量スペクトルの測定は Thermo Scientific™ の Exactive™ Plus を使用して北海道大学 創成研究機構 グローバルファシリティセンター 機器分析受託部門にて分析された。

合成した化合物の一部は ¹HNMR、¹³CNMR、マススペクトルのいずれかを組み合わせて同定した。

減衰全反射赤外(ATR-IR)スペクトルは、サーモフィッシャーサイエンティフィックのニコレティスフィック Nicolet iS10 FT-IR 分光計と GladiATR™ アクセサリを使用して記録した。

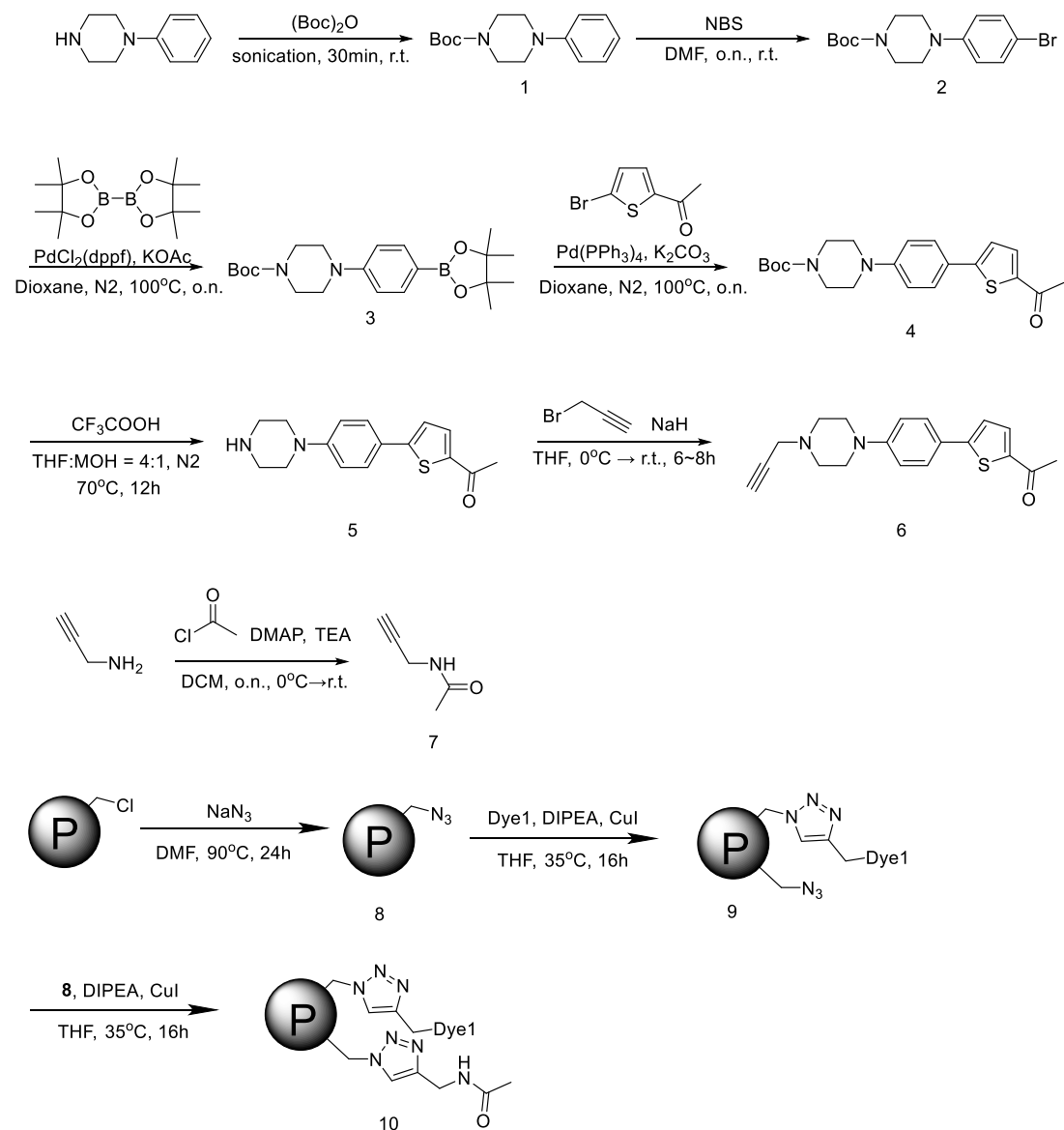
全てのスペクトル測定は、富士フィルム和光純薬工業株式会社製スペクトルグレードの溶媒を用いた。

合成した蛍光ソルバトクロミックビーズの蛍光スペクトル測定は光導波路分光装置 (PLT-5000SLC, システム・インスツルメンツ株式会社、東京都)を用いた。光源は 150W Xe ランプを測定に用いた。光導波路分光装置による測定には両端が光学研磨された高屈折率ガラス導波路(65 × 20 mm、厚み 400 μm、屈折率 1.81)を使用した。

光導波路分光装置による測定条件は入射光の法線角を 53.6° に検出角は 44.0° に設定し測定した。

合成した蛍光ビーズの顕微鏡画像は Nikon eclipse 50i fluorescence microscope、DS-Fi2-L3 microscope camera (Nikon)を使用し、395 nm UV ハンドランプを照射した状態で蛍光発光の様子を撮影した。

2.6.2 合成



スキーム 2. レジンセンサーの合成経路

tert-butyl 4-(phenyl)piperazine-1-carboxylate (1): 30 mL スクリュー型サンプル容器に di-*tert*-butyl dicarbonate (3.77 g, 17.3 mmol) と 1-phenylpiperazine (2 g, 12.3 mmol) を加え、室温、30 min でソニケーションした。反応溶液に H₂O 40 mL を加え、CHCl₃ (15 mL × 3) で抽出した。回収した油層は Na₂SO₄ で脱水し、エバポレーターで濃縮し、白色結晶 **1** (3.21 g, 99.1%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.29 (m, 2H), 6.93 (d, 2H, J = 8.3), 6.89 (t, 1H, J = 7.3), 3.58 (t, 4H, J = 5.1 Hz), 3.13 (t, 4H, J = 5.1 Hz), 1.49 (s, 9H); ESI-HRMS (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₂₃N₂O₂: 263.17540; found: 263.17538.

tert-butyl 4-(4-bromophenyl)piperazine-1-carboxylate (2): 100 mL ナスフラスコに **1** (3g, 11.4 mmol) と DMF 10 mL を加え、その混合溶液に *N*-bromosuccinimide (NBS, 2.10 g, 11.8 mmol) の DMF 10 mL 溶液を 4 時間以上かけて滴下した。混合溶液を遮光し、室温で 24 時間攪拌した。その後反応溶液に H₂O 30 mL を加え CHCl₃ (15 mL × 3) で抽出した。その後、油層を sat. NaHCO₃ 水溶液 (30 mL)、sat. NaCl 水溶液 (30 mL) で洗浄し、油層を Na₂SO₄ で脱水、エバポレーターで濃縮した。粗精製物を hexane で再結晶し、白色結晶 **2** (3.46 g, 89.0%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.35 (dd, 2H, J = 6.8, 2.0 Hz), 6.79 (dd, 2H, J = 6.8, 2.0 Hz), 3.57 (t, 4H, J = 5.1 Hz), 3.09 (t, 4H, J = 5.1 Hz), 1.48 (s, 9H); ESI-HRMS (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₁₅H₂₂BrN₂O₂: 341.08592; found: 341.08586.

tert-butyl 4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)piperazine-1-carboxylate (3): 100 mL ナスフラスコに **2** (0.998 g, 2.92 mmol)、KOAc (0.345 g, 3.52 mmol)、PdCl₂(dppf)CH₂Cl₂ (0.0480 g, 0.0588 mmol) を加え、1,4-dioxane (30 mL) に溶解させた。窒素雰囲気下で 5 分間 100°C にて加熱し、その後反応溶液に bis(pinacolato)diboron (1.11 g, 4.37 mmol) を加え、100°C に加熱し一晩攪拌した。反応溶液を H₂O (30 mL) に加え、ethyl acetate (15 mL × 3) で抽出した。油層を sat. NaCl 水溶液 (40 mL × 2) で洗浄し、Na₂SO₄ で脱水した。粗精製物はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (10% ethyl acetate in hexane) で精製し、白色結晶 **3** (0.981 g, 86.4%) を得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.71 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 6.88 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 3.57 (t, 4H, J = 5.1 Hz), 3.22 (t, 4H, J = 5.1 Hz), 1.48 (s, 9H), 1.32 (s, 12H); ESI-HRMS (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₃₄BN₂O₄: 388.26425; found: 388.26430.

tert-butyl 4-(4-(5-acetylthiophen-2-yl)phenyl)piperazine-1-carboxylate (4): DMF (30 mL) 中の **3** (4.5 g, 12 mmol)、2-アセチル-5-ブロモチオフェン (7.3 g, 35 mmol)、K₂CO₃ (6.5 g, 47 mmol) および テトラキス(トリフェニルホスフィン)パラジウム(0) (0.41 mg, 0.35 μmol) の混合物を 70°C で一晩攪拌した。混合物を H₂O (30 mL) に加えて希釈し、ヘキサン:酢酸エチル = 4:1 (30 mL) で 3 回抽出した。有機層を sat. NaHCO₃ 水溶液 30 mL および sat. NaCl 水溶液 30 mL で洗浄し、次いで Na₂SO₄ で乾燥した。Na₂SO₄ をろ過後、減圧下で有機溶媒

を除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン・CDCl₃の混合液)精製した後、目的物を黄色固体として得た(4.0 g, 11 mmol, 92%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.62 (d, 1H, J = 3.9 Hz), 7.56 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.20 (d, 1H, J = 3.9 Hz), 6.92 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 3.59 (t, 4H, J = 10.3 Hz), 3.22 (t, 4H, J = 9.8 Hz), 2.54 (s, 3H), 1.49 (s, 9H); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 26.3, 28.3, 43.3, 48.3, 79.9, 115.9, 122.2, 124.5, 127.2, 133.6, 141.5, 151.4, 153.2, 154.6, 180.3; ESI-HRMS (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₂₁H₂₆O₃N₂NaS: 409.11568; found: 409.11563.

1-(5-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)thiophen-2-yl)ethan-1-one (5) : 4 (2.5 g, 6.8 mmol)をジクロロメタン (50 mL)に溶解し、CF₃COOH(5.2 mL, 68 mmol)を注意深く滴下した。混合物を室温で終夜撹拌した。混合物を sat. NaHCO₃ 水溶液の添加により中和した後、混合物を CHCl₃(100mL×3)で抽出した。有機層を sat. NaCl 水溶液(100mL)で洗浄し、MgSO₄で乾燥した。MgSO₄をろ過後、減圧下で有機溶媒を除去した。真空下で一晩乾燥させて固体を得、さらに精製することなく次工程に用いた。目的物を黄色固体として定量的に得た。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.62(d, 1H, J = 5.3 Hz), 7.55 (m, 2H), 7.19 (d, 1H, J = 5.38 Hz), 6.92 (m, 2H), 3.22 (t, 4H, J = 13.3 Hz), 3.04 (t, 4H, J = 13.20 Hz), 2.54 (s, 3H); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ (ppm) 26.3, 45.4, 48.4, 114.9, 122.5, 122.7, 127.0, 135.5, 140.7, 152.0, 152.7, 190.3; ESI-HRMS (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₁₆H₁₉N₂OS: 287.12069; found: 287.12126.

1-(5-(4-(4-(prop-2-yn-1-yl)piperazin-1-yl)phenyl)thiophen-2-yl)ethan-1-one (6) : 5(1.7 g, 5.9 mmol)を室温で ACN(20 mL)に溶解させ、K₂CO₃(0.90 g、6.5 mmol)を添加し 1 時間撹拌した。ACN(10 mL)中に溶かしたプロパギルブロミド(0.75 g、6.3 mmol)を含む溶液をゆっくりと滴下した。溶液を一晩加熱還流した。この溶液を水で希釈し、酢酸エチル(30mL×3)で抽出した。有機層を sat. NaCl 水溶液(100mL)で洗浄し、MgSO₄で乾燥した。有機層をセライトでろ過し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン・クロロホルム混合液)を用いて精製した。目的物は黄色固体として得られた(1.4g、3.1 mmol、64%)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.62 (d, 1H, J = 3.9 Hz), 7.56 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.20 (d, 1H, J = 3.9 Hz), 6.93 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 3.38 (d, 2H, J = 2.4 Hz), 3.31 (t, 4H, J = 4.9 Hz), 2.74 (t, 4H, J = 5.1 Hz), 2.54 (s, 3H), 2.29 (t, 1H, J = 2.4 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 26.3, 46.8, 48.1, 51.5, 73.5, 78.4, 115.5, 122.1, 124.1, 127.1, 133.7, 141.4, 151.5, 153.4, 190.3; ESI-HRMS (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₁₉H₂₀ON₂S: 444. 23122; found: 444.23154.

N-(prop-2-yn-1-yl)acetamide ; Ca イオン応答部位 (7) : プロパギルアミンと塩化アセチルを反応させて目的物を得た。合成の詳細は参考論文[34]を参照すること。¹H NMR (400 MHz,

CDCl₃) δ (ppm) 5.83 (s, 1H), 4.04 (t, 2H, $J = 2.4$ Hz), 2.22 (t, 1H, $J = 2.4$ Hz), 2.00 (s, 3H).
ESI-HRMS (m/z) $[M+H]^+$ calcd for C₅H₇ON : 97.12351 ; found : 98.12371.

アジド化メリフィールドレジン (8) : メリフィールドレジン (2.0 g, 0.8~1.2 mmol/g) と NaN₃ (0.52 g, 0.80 mmol) を DMF (20 ml) 中で 90 °C、24 時間、暗所で反応させた。24 時間後、半所で DMF、水、メタノール、アセトンで濾過しながら暗所で洗浄し、真空乾燥機で乾燥させた。この際、保存容器は常に暗所になるように周囲をアルミホイルで覆った。十分に乾燥させた一部の **8** は乳鉢と乳棒を用いて粉碎し、FT-IR を測定した。

Dye1 結合型メリフィールドレジン (9) : **8** (0.10 g, 0.8~1.2 mmol/g) をテトラヒドロフラン[以下、THF] (3.3 ml) 中で 1 時間ほど、暗所で膨潤させた。この THF に **6** と *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.22 mg, 1.7 mmol)、ヨウ化銅(I) (0.40 mg, 2.1 μ mol) を加えて暗所で一晩振とうした。翌日、水、メタノール、アセトン、トルエンを用いて濾過しながら暗所で洗浄を行った。その後、真空乾燥機で乾燥させた。この際、保存容器は常に暗所になるように周囲をアルミホイルで覆った。十分に乾燥させた一部の **9** は乳鉢と乳棒を用いて粉碎し、FT-IR を測定した。

ただし、この反応の際には **6** を等量制御しながら以下の表 1. のように反応させた。

表 1. **6** の加えた量

加えた重量	加えた物質質量
53 mg	0.12 mmol
27 mg	60 μ mol
5.3 mg	12 μ mol
0.32 mg	0.72 μ mol

レジセンサー (10) : **9** (0.10 g) を THF (3.3 ml) 中で 1 時間ほど、暗所で膨潤させた。この THF に **7** と *N,N*-ジイソプロピルエチルアミン (0.22 mg, 1.7 mmol)、ヨウ化銅(I) (0.40 mg, 2.1 μ mol) を加えて暗所で一晩振とうした。翌日、水、メタノール、アセトン、トルエンを用いて濾過しながら暗所で洗浄を行った。その後、真空乾燥機で乾燥させた。この際、保存容器は常に暗所になるように周囲をアルミホイルで覆った。十分に乾燥させた一部の **10** は乳鉢と乳棒を用いて粉碎し、FT-IR を測定した。

ただし、この反応の際には **7** を等量制御しながら以下の表 2. のように反応させた。

表 2. 7 の加えた量

加えた重量	加えた物質質量
12 mg	0.12 mmol
5.8 mg	60 μmol
1.2 mg	12 μmol
7.0 μg	0.72 μmol

2.6.3 Ca イオン応答の FT-IR 及び光導波路分光装置を用いた測定

2.6.3.1 Ca イオン水溶液への浸透から洗浄

精製した **10** (1 mg) を $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ を含むアセトニトリル溶液中 (0.1 M、10 ml) に入れて一晩、100rpm、30°Cで振とうさせた。その後、余分なカルシウムイオンを除去するために水、アセトン、アセトニトリルで洗浄した。また、光導波路分光装置を用いた測定で観測するために同様な条件で **9** も Ca イオンへの振とうした。(図 29)

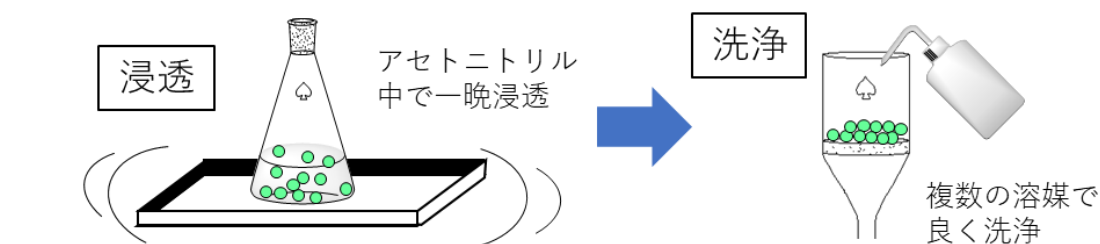


図 29. レジンセンサーの Ca イオンへの応答とその洗浄について

2.6.3.2 レジンセンサーの FT-IR での変化観察

一部の Ca イオンと応答させたレジンセンサーは十分に乾燥させて、水で洗浄する場合とエチレンジアミン四酢酸[以下、EDTA] (2.9 g、10 mmol) と水溶液中で振とうする場合に分けて FT-IR で測定を行った。この際には、Ca イオンへの応答をさせていないレジンセンサーも比較として測定した。

2.6.3.3 光導波路分光装置を用いた測定

FT-IR の測定に用いなかった残りのレジンセンサーは光導波路分光装置を用いて蛍光波長を測定した (図 30)。

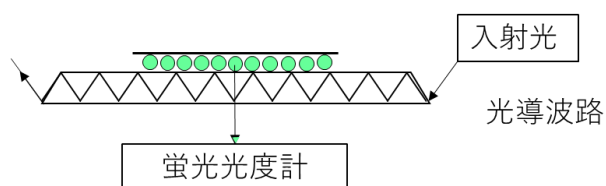


図 30. レジンセンサーの光導波路分光装置を用いた測定

具体的には、Ca イオン応答後の状況変化を確認するため、**9** と **10** のアセトニトリルで膨潤状態したものと、測定を行った。

2.7 結果・考察

2.7.1 レジンセンサーの合成

レジンセンサーの生成を確認するために FT-IR を測定した。

6 を合成する際に等量制御した FT-IR の測定結果を図 31 に示す。ここでは、「dye」は蛍光ソルバトクロミック色素 **6** を示しており、「dye 0.6%~100%e.q.」は **Dye1 結合型メリフィールドレジン 9** を等量制御したものの結果を示している。

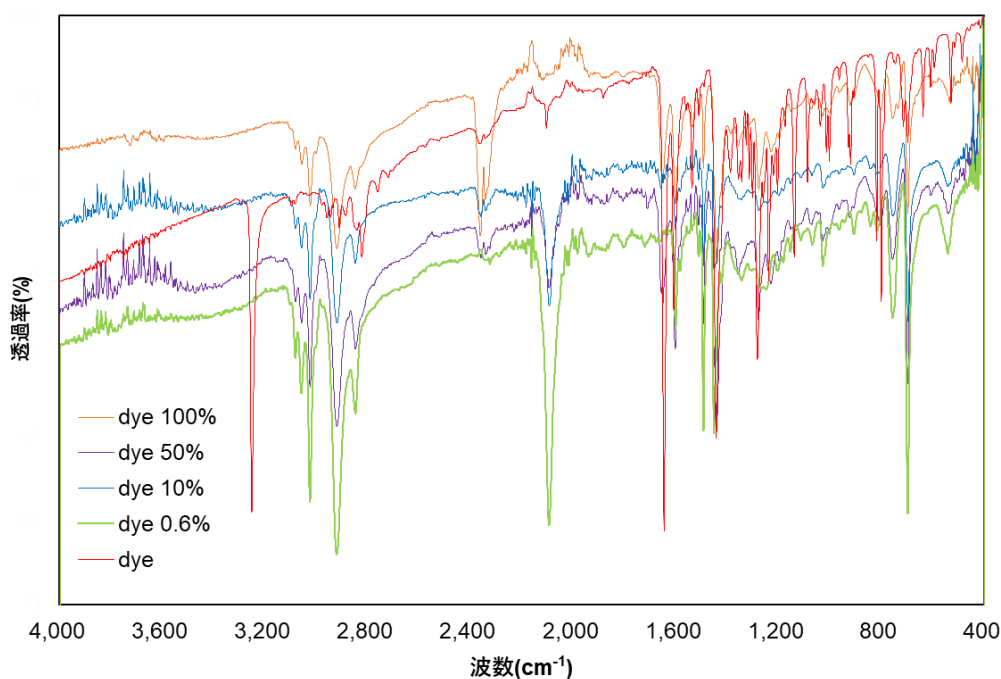


図 31. **Dye1 結合型メリフィールドレジン 9** の FT-IR を測定した結果
(dye: 蛍光ソルバトクロミック色素 **6** と dye 0.6%~100%e.q. まで変化させたそれぞれの
Dye1 結合型メリフィールドレジン 9)

3,800 ~ 2,000 cm^{-1} の範囲を拡大した図を図 32 に、**Dye1 結合型メリフィールドレジン 9** の洗浄前に CHCl_3 中に保管した様子を図 33 にそれぞれ示す。

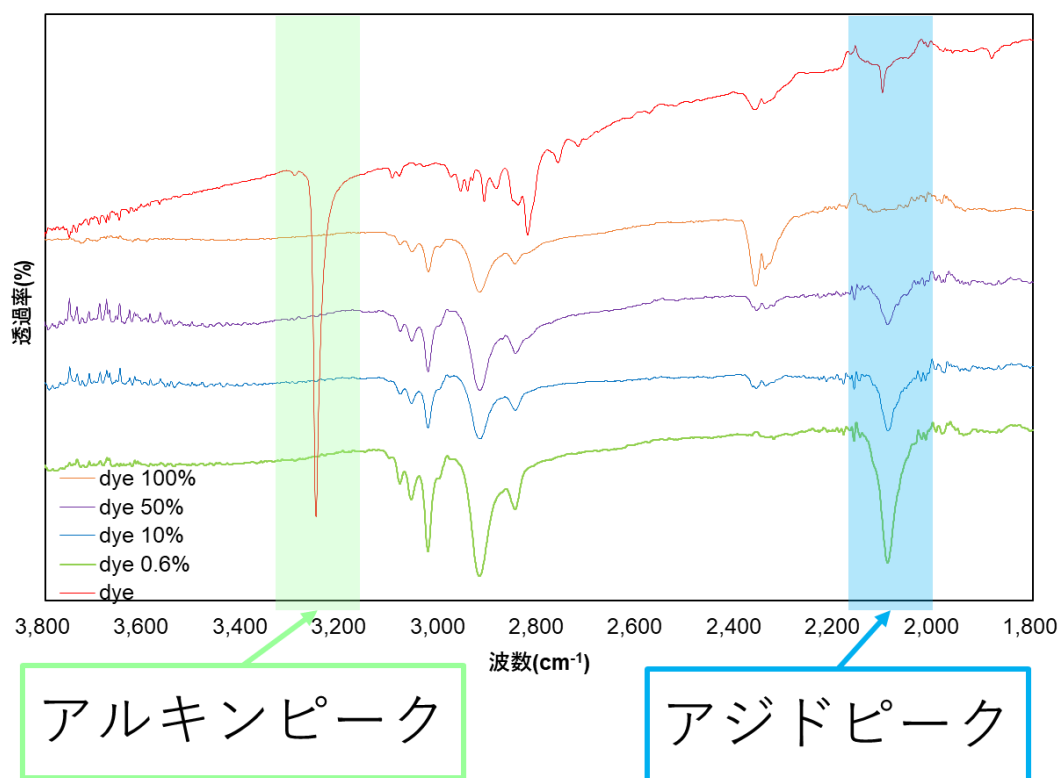


図 32. Dye1 結合型メリフィールドレジン 9 の FT-IR 測定結果
上から Dye1 (6) 自体、6 を 100%e.q.反応させた場合、50 %e.q.反応させた場合、
10%e.q.反応させた場合、0.6%e.q.反応させた場合

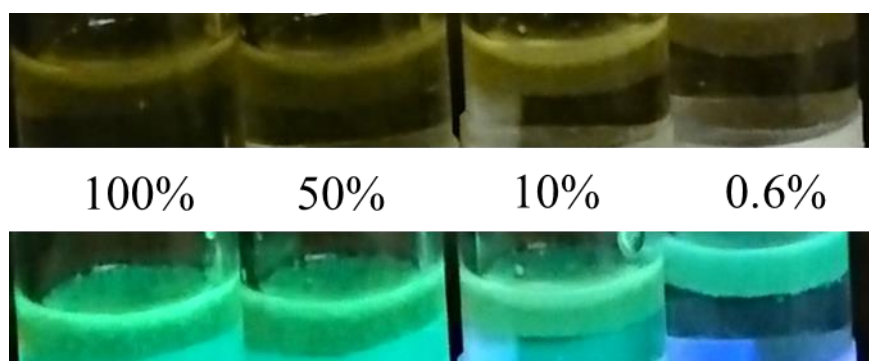


図 33. CHCl_3 中での各レジンセンサーの見た目の変化
左から 100%e.q., 50%e.q., 10%e.q., 0.6%e.q. で 6 を反応させた。

図 32 の結果から、 3250 cm^{-1} 前後のアルキンピークが存在しないことから、十分に洗浄することで余分な色素がレジンセンサーから除去できていることが分かった。

さらに、 2100 cm^{-1} のアジドピークが減少することから、メリフィールドレジンへの等量制御を用いた蛍光溶バトクロミック色素も導入が可能であることが示された。

この結果から、量子収率の高い蛍光溶バトクロミック色素を用いた場合、等量数を0.6%まで減らしても十分な蛍光発光をレジセンサーから観測することができることが分かった。

次に、**7**を同様に等量制御して反応させた結果を図34に示す。

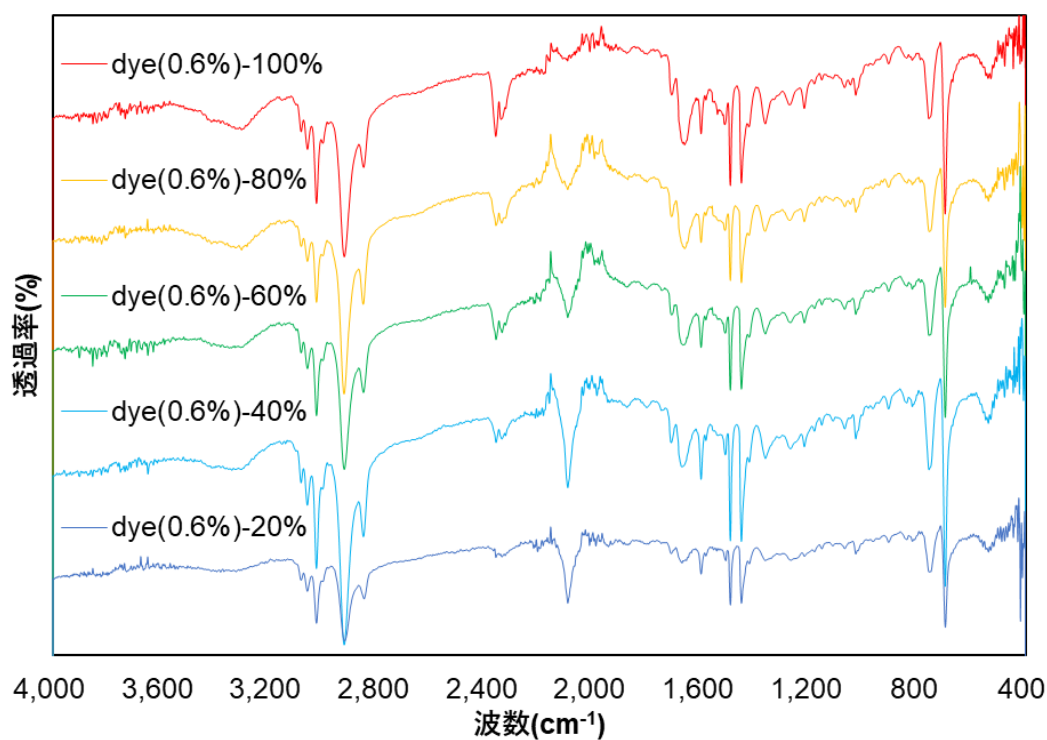


図34. Dye1 結合型メリフィールドレジジン **9** に **7** を反応させ、その等量ごとに FT-IR を測定した結果（上からを 100%e.q.反応させた場合、80 %e.q.反応させた場合、60%e.q.反応させた場合、40%e.q.反応させた場合、20%e.q.反応させた場合）

2,300 ～1,500 cm⁻¹ の範囲を拡大した図を図35に示す。

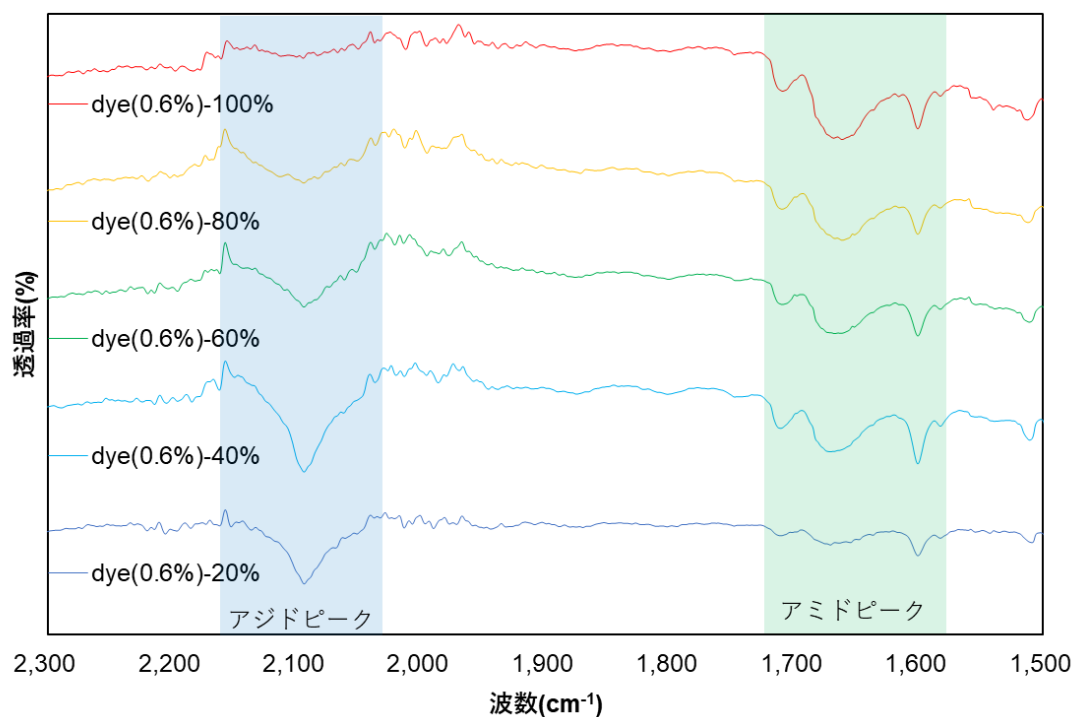


図 35. 図 34 の一部を拡大した比較図

この図 35 の結果から、等量を増やすほどアジドピーク (2150 cm^{-1}) が減少し、アミドピーク ($1450\sim 1500\text{ cm}^{-1}$) が大きくなることが分かる。これは、**9**に残っていたアジド基に**7**が応答することでアジド基が減少するとともに、**7**によるアミド基が導入されて増えていくことが要因と考えられる。以上から、蛍光ソルバトクロミック色素と同様に等量制御を行いながら Ca イオンへの応答部位を導入することができていると考えられる。

2.7.3 Ca イオンへの応答結果

2.7.3.1 FT-IR での測定結果

レジンセンサーに対して Ca イオンを反応させた場合、水で洗浄した場合、EDTA で完全に再生させた場合をただのレジンセンサーのみの場合と比較して FT-IR を測定した結果を図 36 に示す。

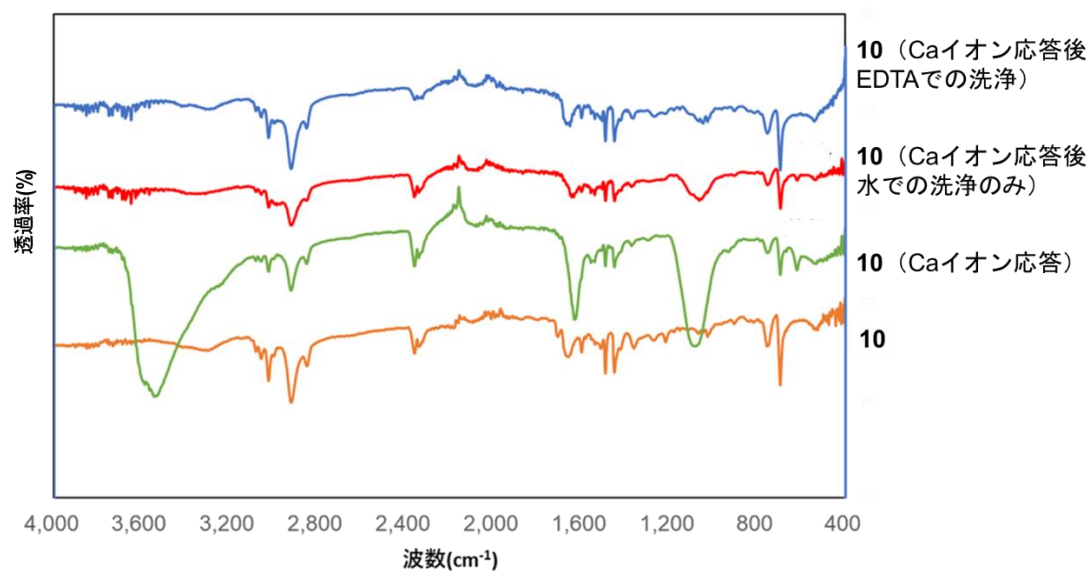


図 36. Ca イオンの捕捉及び洗浄時に起きる FT-IR の測定結果

下から Ca イオンを捕捉する前のレジンセンサーのみの場合、Ca イオンを捕捉した状態のレジンセンサーの場合、水のみで Ca イオンを捕捉した状態のレジンセンサーを洗浄した場合、EDTA で Ca イオンを捕捉した状態のレジンセンサーを洗浄した場合

1,690 ～1,450 cm⁻¹ の範囲を拡大した図を図 37 に示す。

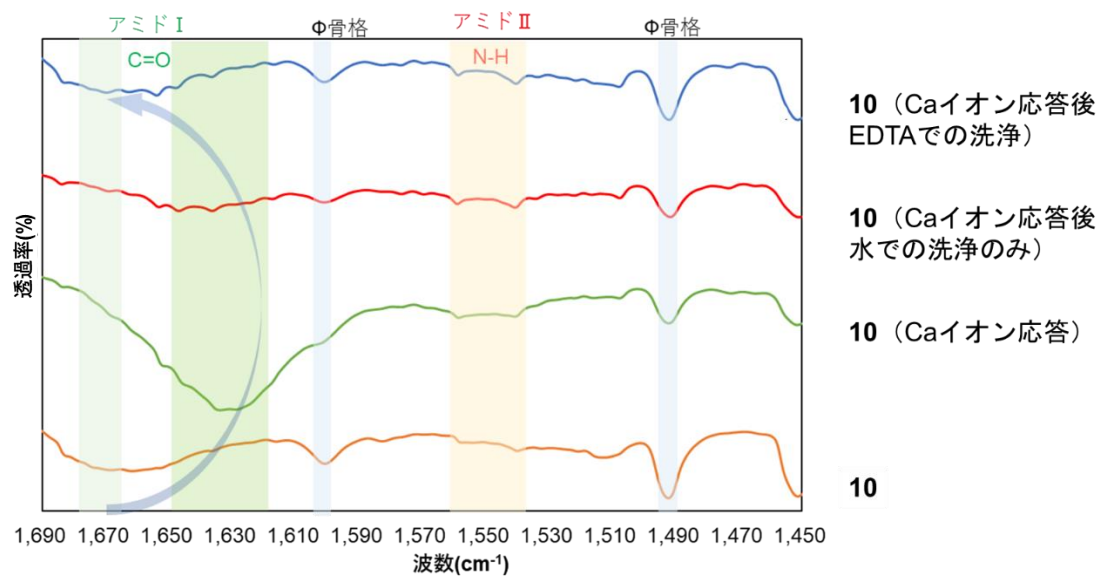


図 37. 図 36 の一部を拡大した比較図

この図 37 より、Ca イオンを捕捉することでアミド I ピークが 1670cm^{-1} から 1630cm^{-1} に変化していることが分かる。このような変化は Halil I. Okur らの研究結果と一致している [35]。一方、水で洗浄を行うとアミド I ピークが 1630cm^{-1} から 1640cm^{-1} に変化している。これは、Ca イオンの捕捉が一部減少したことにより、通常状態のアミド I ピークと Ca イオン捕捉状態のものが混在していることが原因と考えられる。また、EDTA というより強力な Ca イオン捕捉材を用いて洗浄することで、完全にアミド I ピークが 1670cm^{-1} に戻っていることが確認できた。

2.7.3.2 光導波路分光装置を用いた測定結果

光導波路分光装置を用いて測定した結果を図 38 に示す。

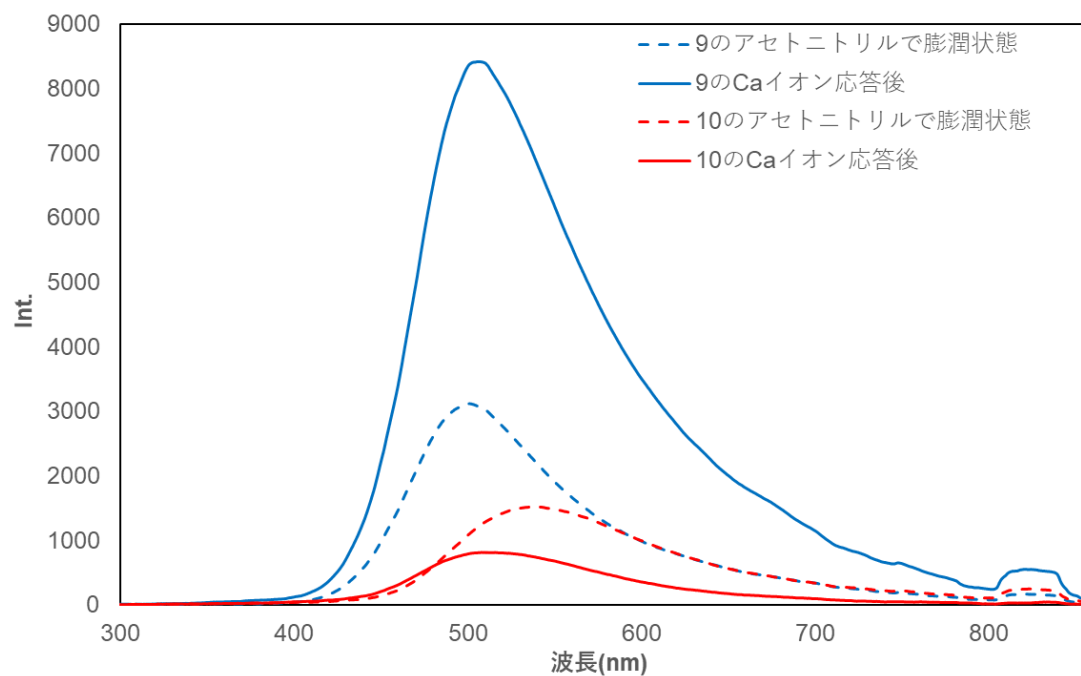


図 38. 9 と 10 の Ca イオン応答前後の様子

蛍光強度に大きな差が出ているが、光導波路の上に置くレジソセンサーの重量を完全に一致させることができないため、本研究ではその波長シフトに着目することとした。

このため、より比較しやすいように図 38 の拡大し応答の変化を示したものを図 39 に示すとともに、その蛍光極大値がどのように変化したかを表 3 に示す。

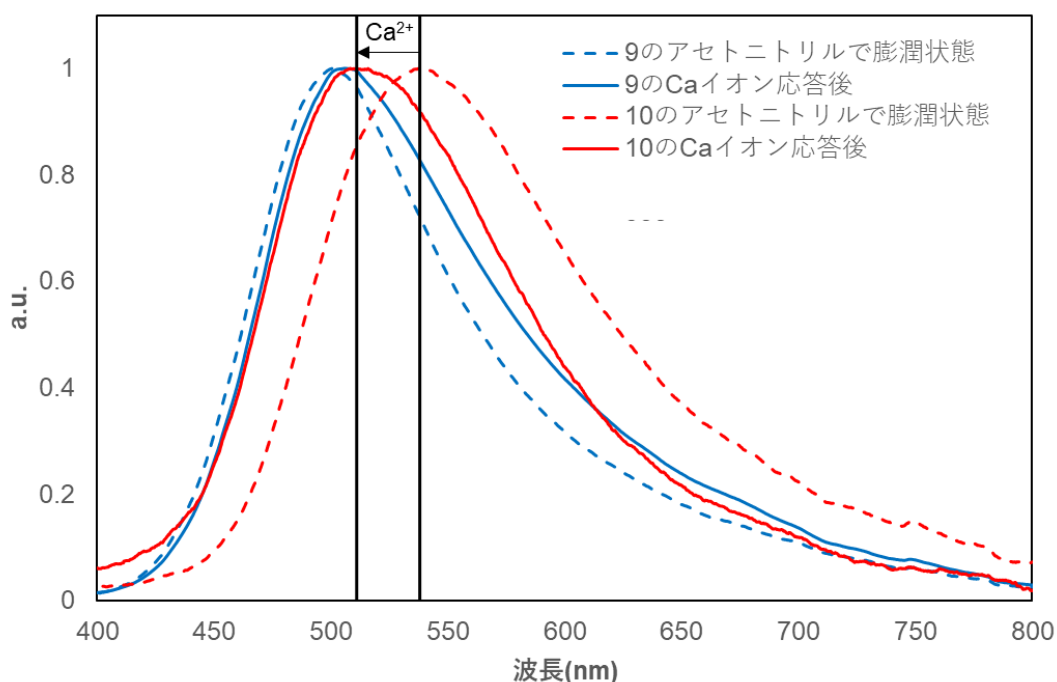


図 39. **9** と **10** の Ca イオン応答前後の様子

表 3. **9** と **10** の蛍光極大波長

	アセトニトリルで膨潤状態	Ca イオン応答後
9	500 nm	510 nm
10	538 nm	511 nm

図 39 より、まず Dye1 結合型メリフィールドレジン **9** に Ca イオンを添加しても大きく蛍光色に変化がないことが分かる。これは、Ca イオン程度では蛍光ソルバトクロミック色素内の励起された分子を溶媒和する能力が低いと考えられる。

一方、レジンセンサー**10** に Ca イオンを応答させた場合、その波長は 538nm から 511nm まで変化した。この変化からは 2 つのことが分かる。1 つ目が、Ca イオン捕捉部位が蛍光ソルバトクロミック色素の周辺に十分に導入されたことで、そのアミド結合によって蛍光ソルバトクロミック色素の分子内電荷移動が妨げられ、蛍光波長が長波長シフトしている。2 つ目に、Ca イオンを捕捉した場合、認識部位が持つアミド結合からの配位がキャンセルされて蛍光波長が Dye1 結合型メリフィールドレジン **9** と同等程度まで短波長化しているという事である。

このことから、色素周囲の極性としては、イオン認識部位を導入した場合の Ca イオン応答時とイオンを認識していない場合の Ca イオンを含んでいる場合が似たような状況であると考えられる。

2.8 成果と課題

本章の研究から、次のような成果をあげることができた。

①メリフィールドレジジンに対して等量制御を用いて蛍光ソルバトクロミック色素と Ca イオン認識部位を導入することができた。

②FT-IR の測定で作製したレジンセンサーの Ca イオンへの応答を観測することができた。

③光導波路分光装置を用いた測定で、有機溶媒中において Ca イオンへの応答を観測することができた。この際に、**10** が Ca イオンに応答した場合に **9** の蛍光波長とほぼそろったことから、図 40 のようなエネルギー順位の変化が起きていると考えられる。

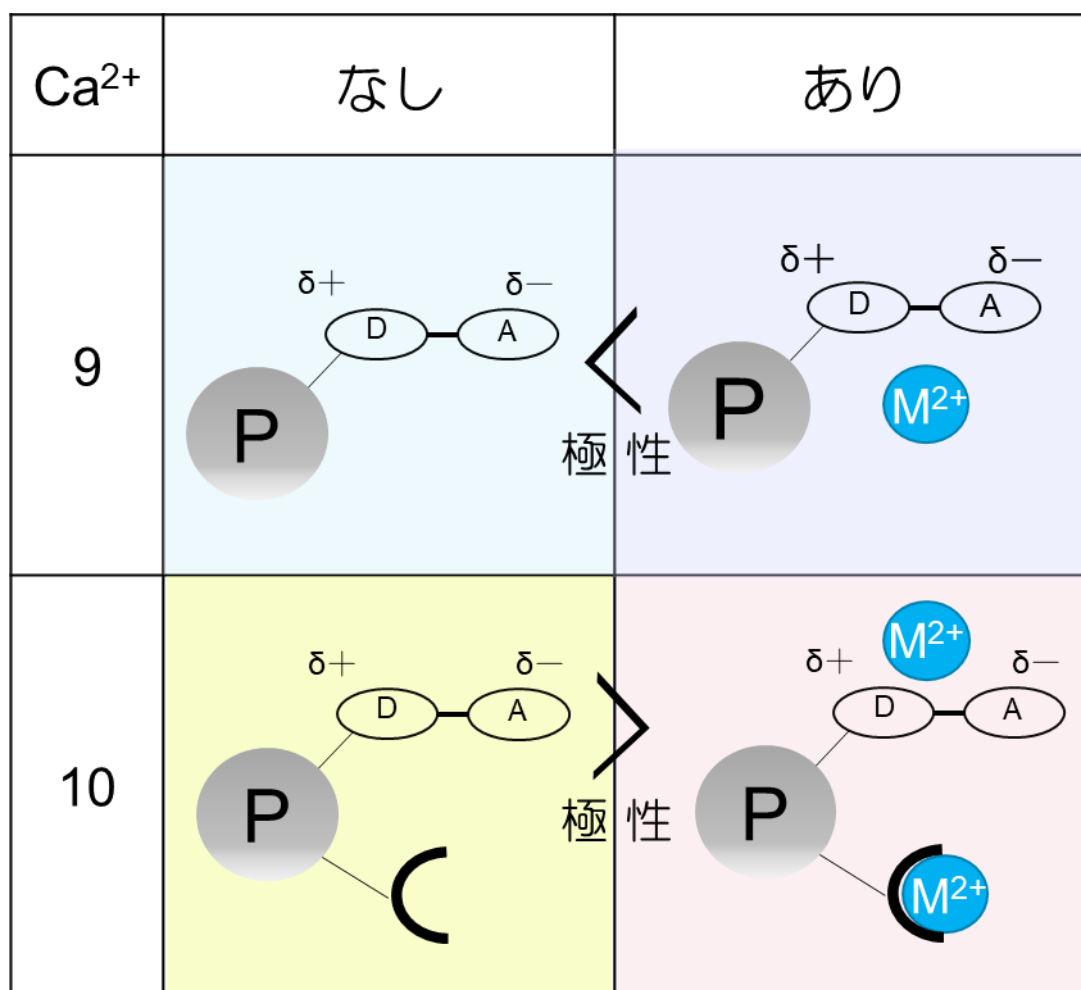


図 40. 9 と 10 の Ca イオン応答前後の導入した色素周囲の極性予想

しかし、このレジンセンサーには課題が 3 つ残った。

①蛍光色変化を観察するには 100mM 程度の濃さの溶液を準備する必要がある。

②蛍光ソルバトクロミック色素の合成以外に、認識部位の合成やそれぞれをメリフィールドレジジンに導入する作業が発生する。

③メリフィールドレジンは水での膨潤率が小さいため、蛍光溶バトクロミック色素が消光してしまい、水中での測定を行う事ができない。

水中で利用することができる蛍光色素導入センサーの開発の観点から、特に③の問題を解決する必要があると判断したため、メリフィールドレジンよりも親水性の高い固相を選択することを考えた。

次章では、そのような目的の元に開発した新たなセンサーについて記す。

第 3 章

ラベル化可能な蛍光ソルバトクロミック色素とアルギン酸ゲルを用いた界面活性剤をセンシングできる化学センサーの開発

3.1 アルギン酸

第2章より、水中に溶解する目的物を蛍光波長の変化で観測するためには、親油性の高い蛍光ソルバトクロミック色素を水中でも利用できるようなポリマーを利用する必要がある。つまり、親水性の高いポリマーを新たに選択する必要があることが分かった。このことから、高い親水性と活用のしやすさで多くの実験に用いられてきたアルギン酸に着目した。

アルギン酸は、褐藻類を加工することで安価に、安定的に供給することができ、古くから環境修復剤や生体への影響が少ない重要な素材の一つとして着目されてきた[36-43]。

アルギン酸は D-マンヌロン酸(M)及び L-グルロン酸(G)が種々の割合で直鎖上に結合した高分子であり、それぞれの構成糖にはカルボキシ基が1つずつ含まれている。(図41) アルギン酸が環境修復剤として利用される場合には、主に2価の陽イオン(Ca^{2+} や Ba^{2+} など)を用いて球状のゲル形態にして利用されることが多い[41,44,45]。

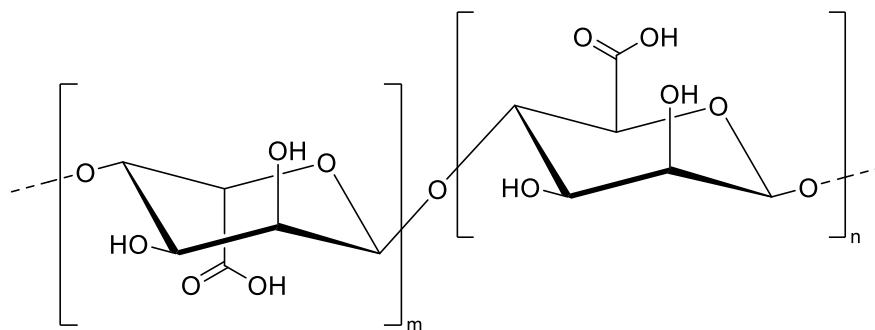


図41. アルギン酸の構造

アルギン酸がこのようなビーズ状の形態をとる理由は、次のような理由があると考えられている。アルギン酸中のMブロックは比較的平坦な構造をしているが、Gブロックはねじれたポケット構造を有している。このGブロック中のカルボキシル基がこの多価金属塩とキレート塩を形成することにより、エッグボックスと例えられる構造を形成することでゲル化していると考えられている[46,47]。(図42)

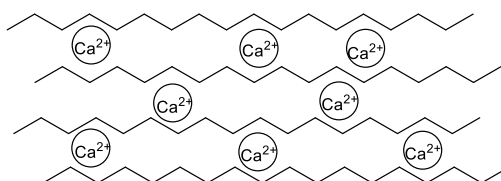


図42. アルギン酸ゲルビーズのエッグボックス構造

また、この方法で形成されたアルギン酸ビーズも含めて多くの環境修復剤の主な吸着量を測定する現在の主流な観察方法は、吸着物質に光の吸収があれば溶液中の残存物質量を吸光光度計で観測したり、蛍光発光がある場合には蛍光光度計で観測したりする方法で観察している。

3.2 蛍光ソルバトクロミック色素を用いた界面活性剤応答型アルギン酸ゲルビーズの開発

本研究では、アルギン酸ゲルビーズに存在するカルボキシ基に結合できるような結合部位を **5** に新たに反応させ、結合した状態での新たな水中で利用することができる蛍光ソルバトクロミック色素導入型アルギン酸ゲルビーズ[以下、ゲルセンサー]を作製することとした。

アルギン酸ゲルビーズはその生態毒性の少なさから近年ではマイクロカプセル状に加工して目的物を輸送する研究に着目されているが[46-48]、この他にも吸着剤としての機能があることも知られている。この際に吸着するゲスト分子として良く用いられているのがカチオン性の色素や界面活性剤である[5,45,49]。(図 43)

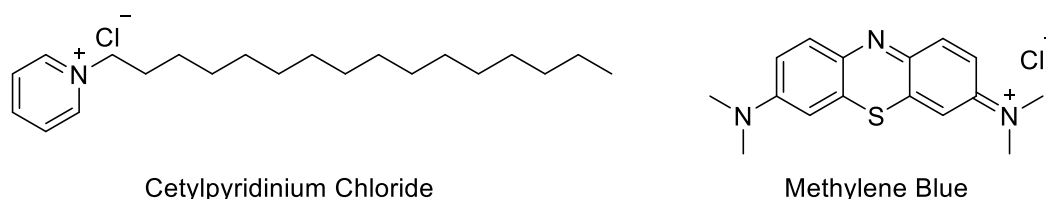


図 43. よく用いられる界面活性剤やメチレンブルーの構造式

本研究においては、そのゲスト分子がアルギン酸ゲルビーズに吸着されることで導入されている蛍光ソルバトクロミック色素の周囲極性が変化するような化合物が評価する際には適していると考え、カチオン性界面活性剤である Cetylpyridinium Chloride [以下、CPC] を用いて、臨界ミセル濃度[以下、CMC]以下でも測定することができるゲルセンサーを作製することとした。(図 44)

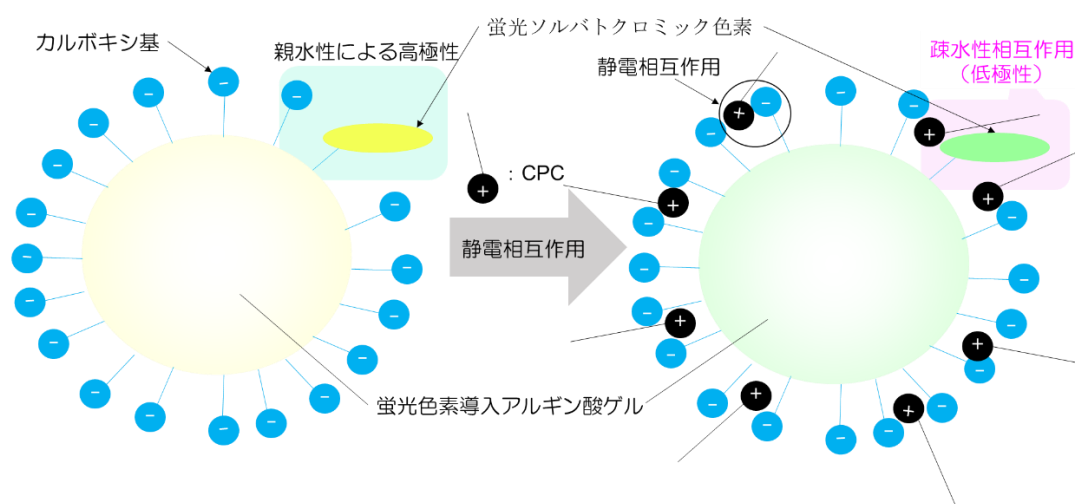


図 44. ゲルセンサー内での CPC と蛍光ソルバトクロミック色素の関係概念図

3.3 比色法と画像解析

本研究で作製するゲルセンサーは蛍光溶バトクロミック色素を導入しているが、その強みの一つに「目で見ても色鮮やかな蛍光変色」することが挙げられる。このことから、その色変化を直接数値化して評価することで、より簡便に性能評価することができるのではないかと考えた。

3.3.1 画像解析

画像解析の技術は生体から工業的な分野まで幅広く利用されている。

例えば、生体分野では顕微鏡画像などからどれだけの細胞が含まれているのかカウントする技術や、大きさを比較する、複数の画像データを用意することで画像内のノイズや歪みを除去することなどに利用されている[50,51]。工業分野では製品の検品や顔認証システムなどに利用されている[52]。

これらの画像解析においては、色変化などを数値に直接変換して置き換えており、その形式としては RGB 形式、HSV 形式の 2 つの変換方式が良く用いられている。この中でも本研究では HSV 形式に着目した。HSV とは、色を「色相(Hue)」「彩度(Saturation)」「明度(Value)」の 3 要素で表現する方式である。それぞれをより詳しく解説すると、「色相(Hue)」は、赤や緑といった具体的な色を定義する要素であり、色が環状に並んでいるため、 $0^{\circ} \sim 360^{\circ}$ の範囲の値で表されることが多い。(図 45)

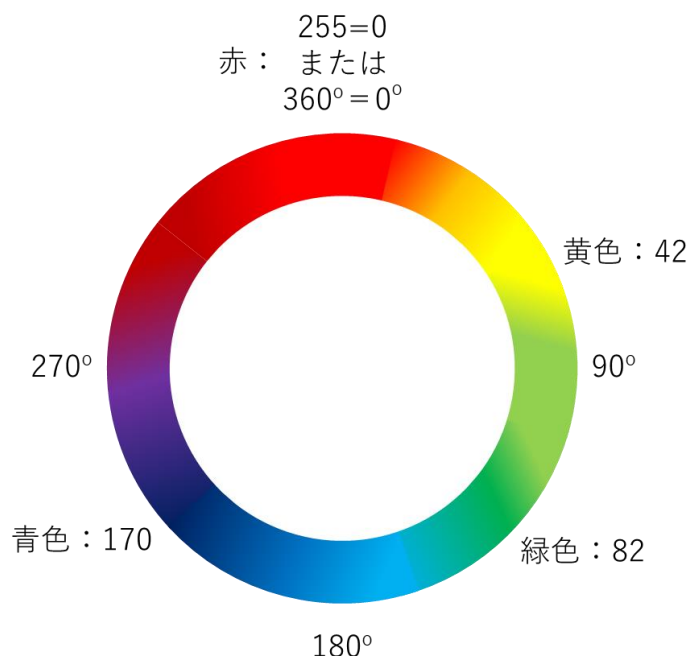


図 45. 色相環と各色との関係

彩度とは、色相で定義された色の鮮やかさ・濃さを表す要素で、0%～100%の範囲で表さ

れることが多い。100%が最も鮮やかで、彩度の減少に合わせて色が薄くなっていき、0%になると灰色になる。彩度が低下すると赤緑青のうち最も強い成分に向かって収束する。(図 46)



図 46. 彩度の変化

明度とは、色相で定義された色の明るさ・暗さを表す要素で、0%～100%の範囲で表されることが多い。100%が最も明るく、明度の減少に合わせて暗くなり、0%で黒になる。明度は赤緑青のうち最も大きな値で定義され、彩度 0%で収束する色の値となる。(図 47)



図 47. 明度の変化

本研究では、この HSV 形式を適用することにより蛍光光度計を用いることなく、より簡便に調べることができるかを否かについても検討した。

3.4 実験項

3.4.1 試薬および機器

すべての試薬は和光純薬から購入し、そのまま使用した。

合成反応は薄層クロマトグラフィー 60F₂₅₄ (layer thickness, 0.25 mm; E. Merck, Darmstadt, Germany)によって反応の進行を確認した。目的化合物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製した。精製に使用したシリカゲルは Wakosil® C-300 (0.04–0.06 mm,富士フィルム和光純薬株式会社)を用いた。

核磁気共鳴(NMR)スペクトルは、日本電子株式会社(東京)製の JNM-EX400 を用いて記録し、テトラメチルシラン(TMS)を基準とした。

精密質量スペクトルの測定は Thermo Scientific™ の Exactive™ Plus を使用して北海道大学 創成研究機構 グローバルファシリティセンター 機器分析受託部門にて分析された。

合成した化合物の一部は ¹HNMR、¹³CNMR、マススペクトルのいずれかを組み合わせて同定した。

吸収スペクトルには紫外–可視分光光度計 JASCO 製の V-560 または V-770 分光光度計を用いて測定した。

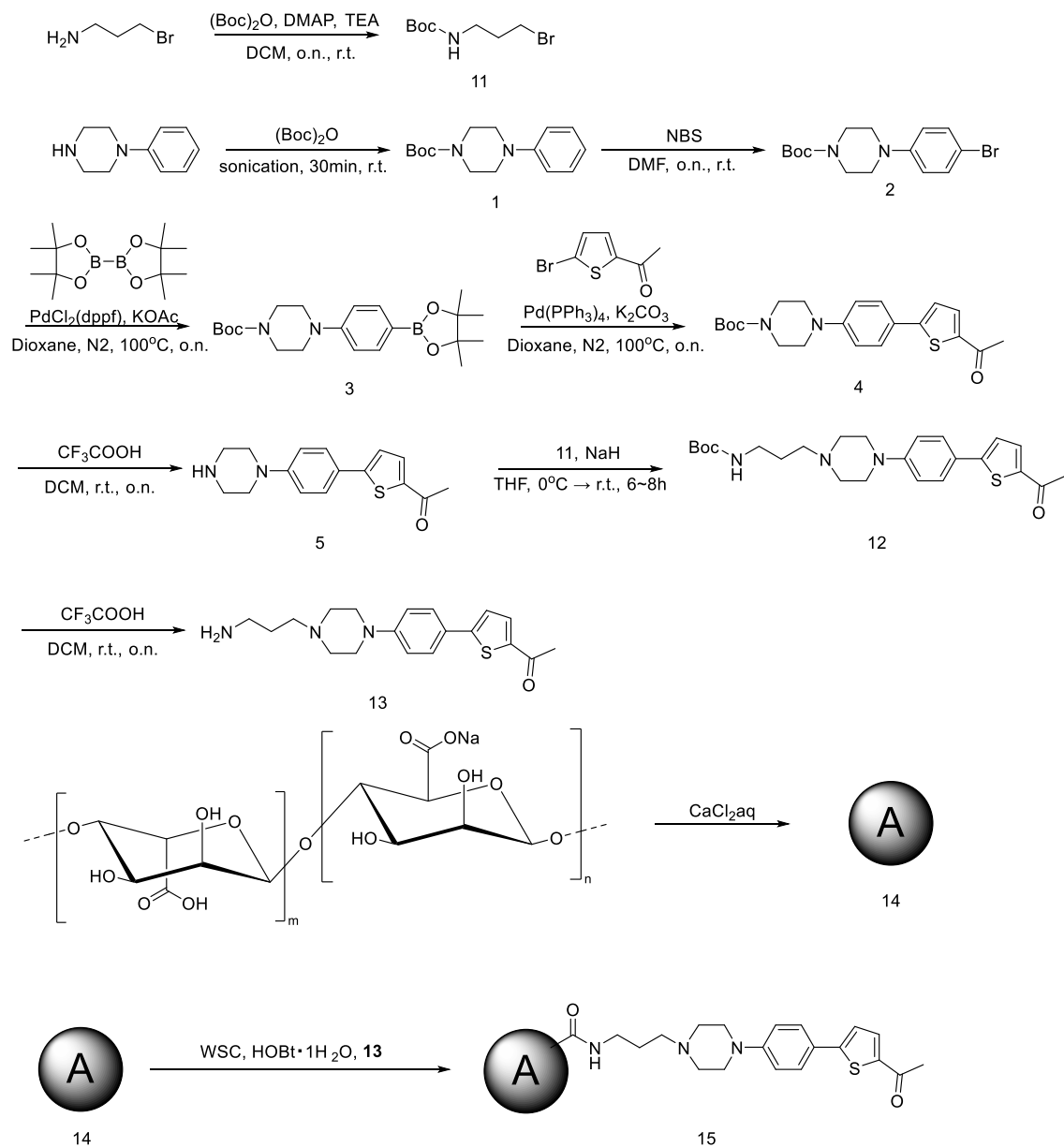
全てのスペクトル測定は、富士フィルム和光純薬工業株式会社から販売されているスペクトルグレードの溶媒を用いた。

色素溶液の吸収スペクトル測定には JASCO V-560 spectrometer(日本分光株式会社、東京都)、蛍光スペクトルの測定には FP-6600 (日本分光株式会社、東京都)を使用した。

減衰全反射赤外(ATR-IR)スペクトルは、サーモフィッシャーサイエンティフィックのニコレティスフィック NicolettiS10FT-IR 分光計と GladiATR™ アクセサリを使用して記録した。

顕微鏡観察は、オリンパス研究用ハイグレードステレオスコープ SZX16 またはオリンパス倒立蛍光顕微鏡 IX70-S1F を用いて行った。

3.4.2 合成



スキーム 3. アルギン酸ゲルビーズ用蛍光ソルバトクロミック色素の合成とゲルセンサーの合成

tert-butyl 4-phenylpiperazine-1-carboxylate (1) : 2.6.2 参照

tert-butyl 4-(4-bromophenyl)piperazine-1-carboxylate (2) : 2.6.2 参照

tert-butyl 4-(4-(4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaborolan-2-yl)phenyl)piperazine-1-carboxylate (3) : 2.6.2 参照

tert-butyl 4-(4-(5-acetylthiophen-2-yl)phenyl)piperazine-1-carboxylate (4) : 2.6.2 参照

1-(5-(4-(piperazin-1-yl)phenyl)thiophen-2-yl)ethan-1-one (5) : 2.6.2 参照

1-(5-(4-(4-(prop-2-yn-1-yl)piperazin-1-yl)phenyl)thiophen-2-yl)ethan-1-one (6) : 2.6.2 参照

tert-butyl (3-bromopropyl)carbamate (11) : 参考文献[53]を参照すること。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 4.64 (s, 1H), 3.44 (t, 2H, J = 6.6 Hz), 3.28 (dd, 2H, J = 6.3, 12.7 Hz), 2.05 (t, 2H, J = 6.5 Hz), 1.44 (s, 9H) ;ESI-HRMS (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₈H₁₆O₂NBr: 260.02542 ; found: 260.02566.

tert-butyl (3-(4-(4-(5-acetylthiophen-2-yl)phenyl)piperazin-1-yl)propyl)carbamate (12) : 6(1.4 g, 4.9 mmol)を THF(20 mL)に 0°Cで溶解した。この溶液に、NaH(50~72 %, 0.24 g、5.4 mmol)を添加した。THF(10ml)に 11(1.5 g、5.4 mmol)を溶かした溶液をゆっくりと滴下した。溶液を一晩氷浴で室温に維持した。この溶液を水で希釈し、酢酸エチル(30ml×3)で抽出した。有機層を sat. NaCl 水溶液(100 mL)で洗浄し、MgSO₄で乾燥した。有機層をセライトでろ過し、濃縮した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(ヘキサン・クロロホルム混合液)で精製した。目的物は黄色固体として得た(1.4 g、3.1 mmol、64 %)。¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 7.62 (d, 1H, J = 3.9 Hz), 7.55 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 7.19 (d, 1H, J = 3.9 Hz), 6.91 (d, 2H, J = 8.8 Hz), 3.26 (m, 6H), 2.60 (t, 4H, J = 9.8 Hz), 2.54 (s, 3H), 2.47 (t, 2H, J = 13.2 Hz), 1.71(t, 2H, J = 13.18 Hz), 1.44 (s, 9H) ; ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm) 26.3, 28.4, 39.7, 48.2, 49.0, 52.9, 53.1, 56.6, 78.8, 115.3, 115.9, 119.6, 122.0, 124.0, 127.1, 129.0, 133.7, 141.3 151.2, 151.5, 153.4, 156.0, 190.3, ;ESI-HRMS (m/z) [M+H]⁺ calcd for C₂₄H₃₄O₃N₃S: 444.23122 ; found: 444.23154.

1-(5-(4-(4-(3-aminopropyl)piperazin-1-yl)phenyl)thiophen-2-yl)ethan-1-one (13) : 12(1.4g、3.1 mmol)をジクロロメタン(50ml)に溶解した。CF₃COOH(2.4 ml、0.13 mol)を溶液にゆっくりと添加し、混合物を室温で一晩攪拌した。混合物に sat. NaHCO₃ aq を加え

ることによって中和した。混合物を CHCl_3 (100 mL \times 3) で抽出した。有機層を sat. NaCl aq (100 mL) で洗浄し、 MgSO_4 で乾燥し濃縮した。得られた固体を真空乾燥し、さらに精製することなく次工程に用いた。目的物を黄色固体として得た (0.99 g, 2.9 mmol, 92 %)。 ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm) 7.62 (d, 1H, $J=3.9$ Hz), 7.54 (d, 2H, $J=16.1$ Hz), 7.19 (d, 1H, $J=3.9$ Hz), 6.92 (d, 2H, $J=8.8$ Hz), 3.28 (m, 6H), 2.63 (m, 4H), 2.54 (s, 3H), 2.47 (m, 2H, $J=7.32$ Hz), 1.88 (m, 2H); ESI-HRMS (m/z) $[\text{M}+\text{H}]^+$ calcd for $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{OS}$: 344.17851; found: 344.17911.

無修飾のアルギン酸ゲルビーズの調製 (14): アルギン酸ゲルビーズは、参考文献[41]に与えられた手順を用いて調製した。アルギン酸ナトリウム水溶液 200 mL (300~400 cp, カルボキシ基 0.01 mol に相当する 2 g) を CaCl_2 水溶液 (20 g, 0.18 mol, 200 mL) に滴下した。生成したアルギン酸ゲルビーズを常温下真空ポンプで吸引しながら十分に水洗し、水中に保存した。得られたアルギン酸ゲルビーズの一部を 24 時間乾燥させ、秤量した。結果は、3.56 mg (参考文献[36]から 1 つのビーズにつき 9.1 μmol のカルボキシル酸残基があるとわかった)。

蛍光ソルバトクロミック色素結合アルギン酸の調製 (15): 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩[以下、WSC] (0.44 g, 2.5 mmol) を水と DMF の混合溶液 10 mL (1:1) 中に溶かし、その溶液にアルギン酸ゲルビーズ (乾燥重量 3.6 g, 9.1 mmol, 100 ビーズ) を 5°C で添加し、100 rpm で 30 分間攪拌した。この混合溶液を 5 つ用意した。その後、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール-水合物[以下、HOBt \cdot $1\text{H}_2\text{O}$] を水 (10 mL) に溶かした HOBt 水溶液 (0.17 g, 1.2 mmol) をそれぞれに加えて 5°C、100 rpm で 30 分間攪拌した。これらの得られた混合物に 0.50、5.0、10、25、および 50 mol% e.q. の **13** を添加し、30°C、100 rpm で 24 時間攪拌した。次に 5 つのアルギン酸結合蛍光ソルバトクロミック色素 **15** (それぞれに合わせて **15a-e** とする) を水とアセトン、メタノールの順で徹底的に洗浄し、次いでソックスレー抽出器を用いてジクロロメタンで 24 時間洗浄した。ビーズは水中で保存した。この際に、**15a,b** についてはその平均重量を秤量した。(**15a**: 4.2 mg、**15b**: 4.4 mg)

3.4.3 CPC 吸着実験

3.4.3.1 CPC の時間依存吸着

14 と **15a** または **15b**(それぞれ 5 ビーズ)に、200 μ M の CPC 水溶液をそれぞれ 10 mL 添加した。これらの溶液を 30°C、100rpm で攪拌し、0、10、30、60、90、120、150、210 分の所定の時間に溶液を取り出して吸光度を測定した。(図 48)

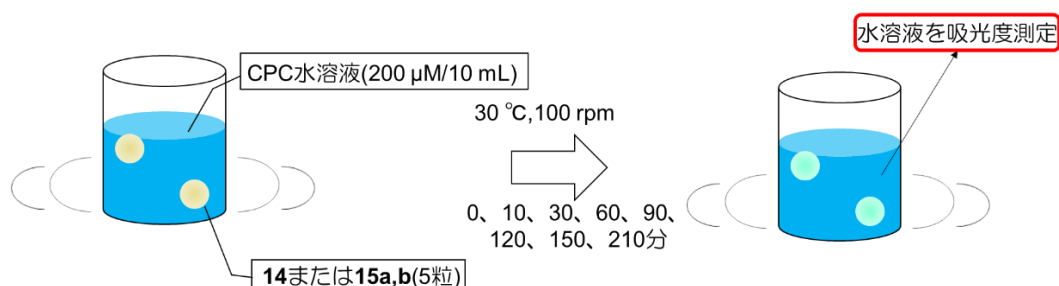


図 48. **14** と **15a,b** の CPC 吸着挙動確認実験図

3.4.3.2 ソルバトクロミズムの応答確認

ソルバトクロミズムの応答を確認するために **12** を各種有機溶媒(メタノール、DMSO、DMF、ジクロロメタン、酢酸エチル、THF、1,4-ジオキサン、トルエン、ヘキサン)に溶解させ、吸収スペクトル測定用の色素溶液は 23.6 μ M、蛍光スペクトル測定用の色素溶液は 236 nM の濃度でそれぞれ調製し、測定用の試料とした。吸収測定および発光測定のための試料は 1 cm×1 cm の標準石英セルを使用し、Xe アークランプを光源として、スリット幅は 5 nm で測定した。

また、**15a** または **15b**(それぞれ 5 ビーズ)を水、メタノール、DMF、アセトン、THF、酢酸エチル、ジクロロメタン、クロロホルム、トルエン、ヘキサンの各種溶媒 10 mL に添加した。これらの溶液を 30°C、100rpm で 24 時間攪拌し、ゲルセンサーを取り出して画像解析した。(図 49)



図 48. **15a,b** のソルバトクロミズム応答確認実験図

3.4.3.3 CPC の静置吸着

15a(10 ビーズ)を含む CPC(400 μ M、3.0 mL)の水溶液を、吸収波長 255 nm における吸光度を、吸光光度計を用いて 13 時間にわたって観察した。同時に、**15a** および **15b**(それぞれ 1 ビーズ)を含む CPC 水溶液(400 μ M、0.30 mL)をオリンパスの倒立型蛍光顕微鏡 IX70-S1F を用いて撮影し、画像を解析した(HSV 形式)。(図 50)

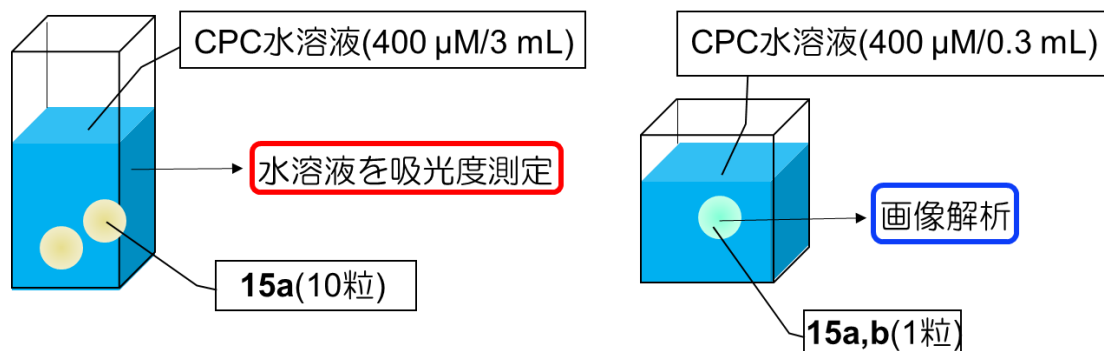


図 50. **15a,b** の CPC 吸着に関する静置実験図

3.4.3.4 CPC の濃度依存吸着

CPC 吸着実験を **15a** および **15b**(それぞれ 5 ビーズ)を用いて、30 $^{\circ}$ C、48 時間、100rpm で行った。これらの溶液の独立した系に、0~1000 μ M の範囲の様々な濃度の CPC 水溶液を添加した。ビーズを単離し、水で軽く洗浄し、水中に保存した。次に、オリンパス実体顕微鏡 SZX16 と 375 nm 励起を使用してビーズを撮影し、画像を解析した(HSV 形式)。

この際に、残った CPC 濃度を、吸光光度計を用いて測定して 0~400 μ M まで検量線を作製し算出した。(図 51)

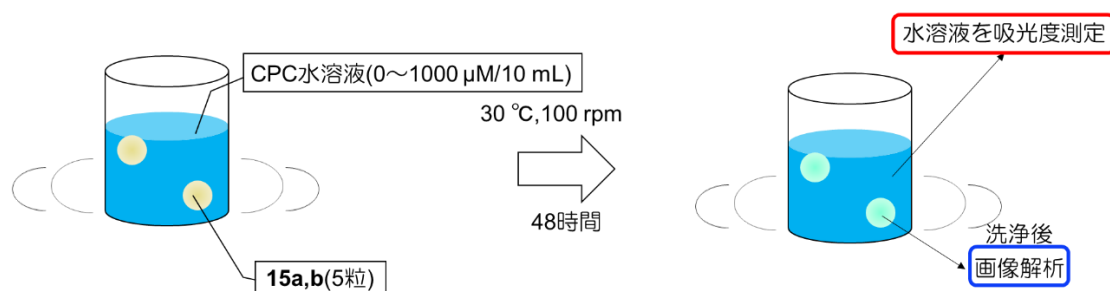


図 51. **15a,b** の CPC 濃度応答確認実験図

3.4.3.5 **15a** の性能評価

ゲルセンサー**15a** の性能評価をするために CPC 以外の界面活性剤に対する吸着挙動を見ることとした。対象としてはカチオン性界面活性剤である Cetyl trimethyl ammonium bromide(以下、CTAB)、非イオン系界面活性剤である Triton X-100、Dodecyl benzene sulfonic Acid Sodium(以下、DBS)を選択した。3.4.3.4 節と同様の条件で濃度を 0 M、

10 μM 、50 μM 、100 μM 、200 μM 、400 μM 、600 μM 、800 μM 、1000 μM に変更して吸着実験を行い、振とう終了後にゲルセンサーを取り出し画像解析を行った。

また、CPC 水溶液については、5mM、10 mM、50 mM、100 mM の濃度の水溶液に対する色調変化を観察することで、検出限界を確認することとした。

3.4.4 画像解析

jpeg 形式で保存されたキャプチャ画像は、オープンソースソフトウェア ImageJ(<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>)と Type→HSB スタック方式を使用して HSV 形式に変換された。「分析」→「ヒストグラム」で得られた「リスト」の値を元に分析する。「リスト」は、(1)画像の 300×300 ピクセルを切り出し、(2)「解析」「ヒストグラム」で得られた「リスト」の値を取得し、(3)得られた値を算出して解析した。(図 52)

具体的な算出方法は以下の通りである。

(1)リストから取得した色相値にピクセル数を掛ける。

(2)すべての合計を 90,000(= 300×300)で割る。

この時、Hue 値は HSV 形式であるため、彩度を下げたときに選択される最も強い色は 0～255 の数値で表される。例えば、色相の値は、赤の場合は 0 または 255、黄の場合は 42、緑の場合は 82、青の場合は 170 となる。

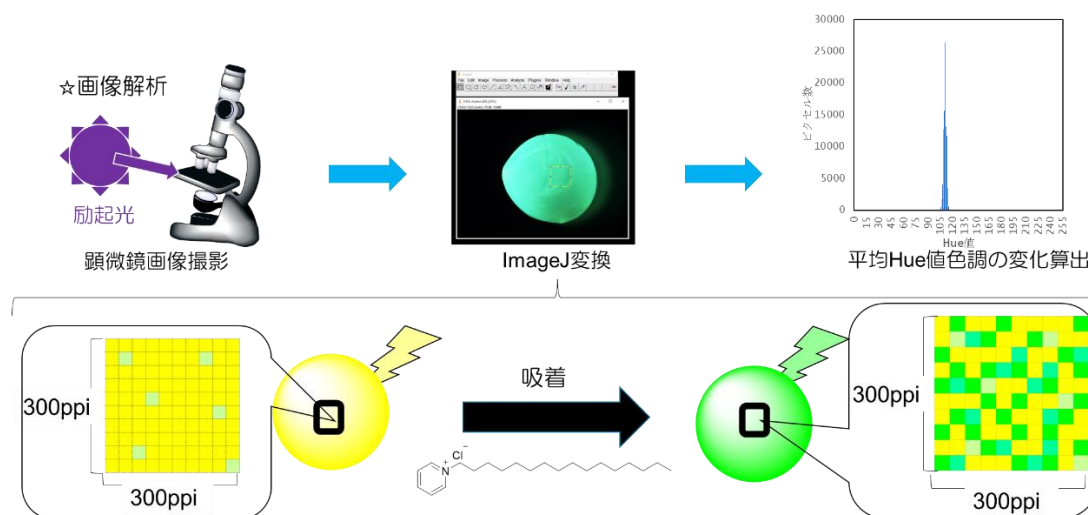


図 52. ImageJ を用いた HSV 変換による画像解析法

3.5 結果と考察

3.5.1. 15 の合成結果

15 は NMR を使用できないため、赤外分光法を用いて 15 にアミド結合の生成を確認することとした。結果を図 53 に示す。

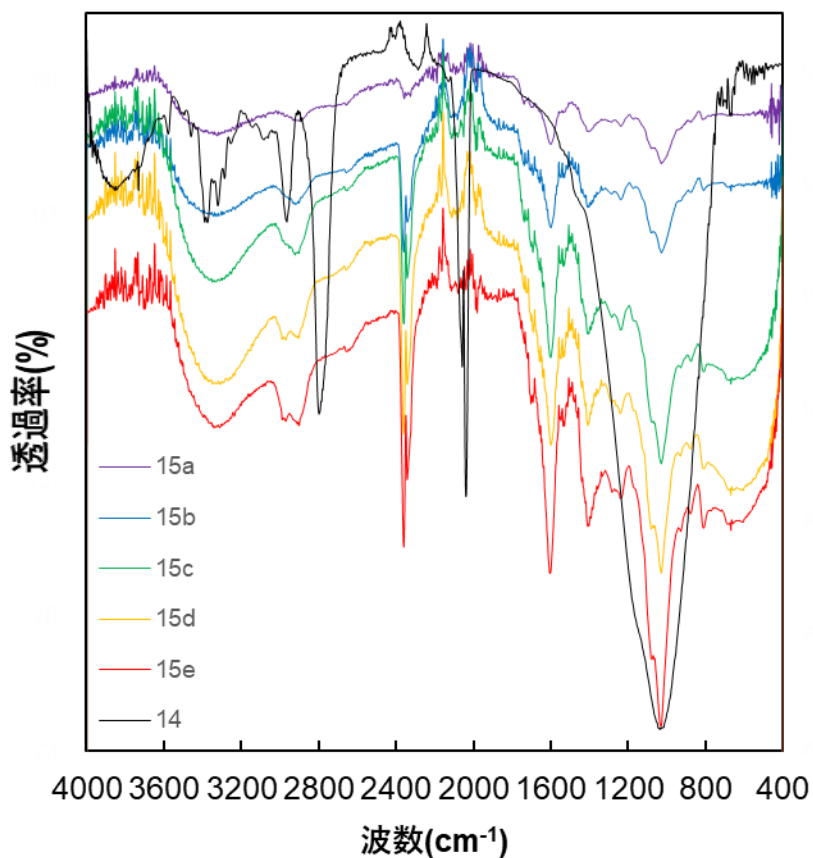


図 53. 14 及び 15a -e の FT-IR スペクトルの結果

15a - e について 2,000 ~1,200 cm^{-1} の範囲を拡大した図を図 54 に示す。

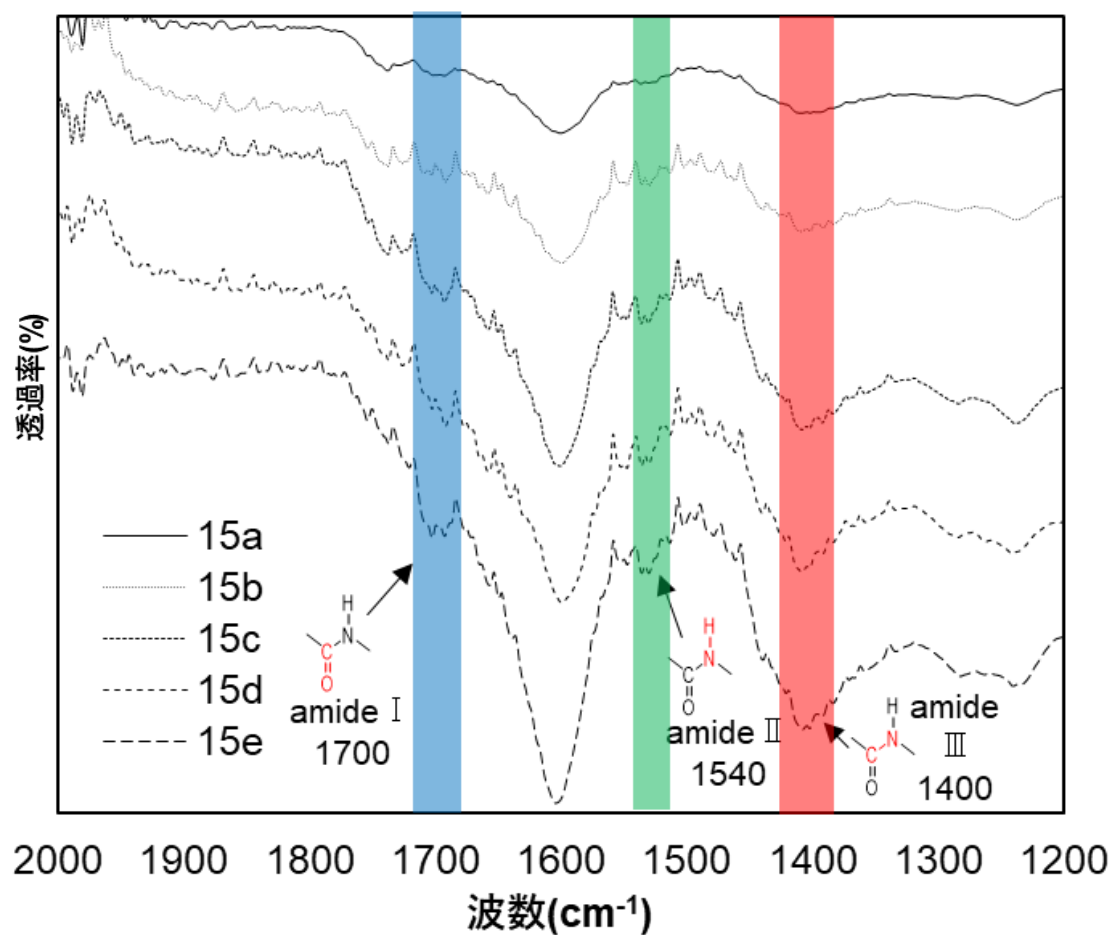


図 54. 15a-e の FT-IR スペクトルを拡大して分析したもの

この図 54 の結果から、蛍光ソルバトクロミック色素の量が増えるにつれてアミドバンドの強度が増加していることが分かる。また、WSC の反応によって誘導された尿素生成物がこれらの色素複合体に存在しないことも示された。

次に、図 55 に 15a-e の写真画像を示す。

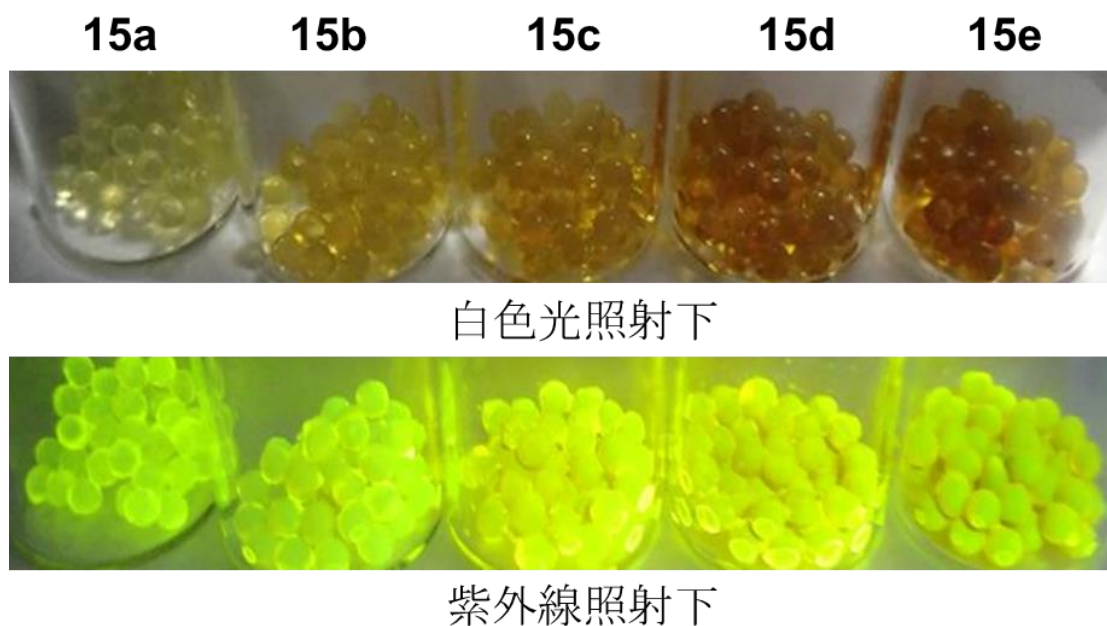


図 55. **15a-e** の画像(上:白色光照射、下:紫外線照射)。

図 55.から **15c** が最大蛍光強度を示していることを示している。

一方、**15d,e** は蛍光強度が低下しており、蛍光ソルバトクロミック色素の導入量が多すぎることによる自己消光の影響と考えられる。

このことから、**15c** の発光特性も蛍光ソルバトクロミック色素自体の影響がかかわる可能性があるとは推論した。その結果、この後の実験には **15a** と **15b** を選択した。

3.5.2. ソルバトクロミズムの応答確認

12 の吸収スペクトルの測定結果を図 56、励起スペクトルの測定結果を図 57、蛍光スペクトルのノーマライズした測定結果を図 58 に示す。

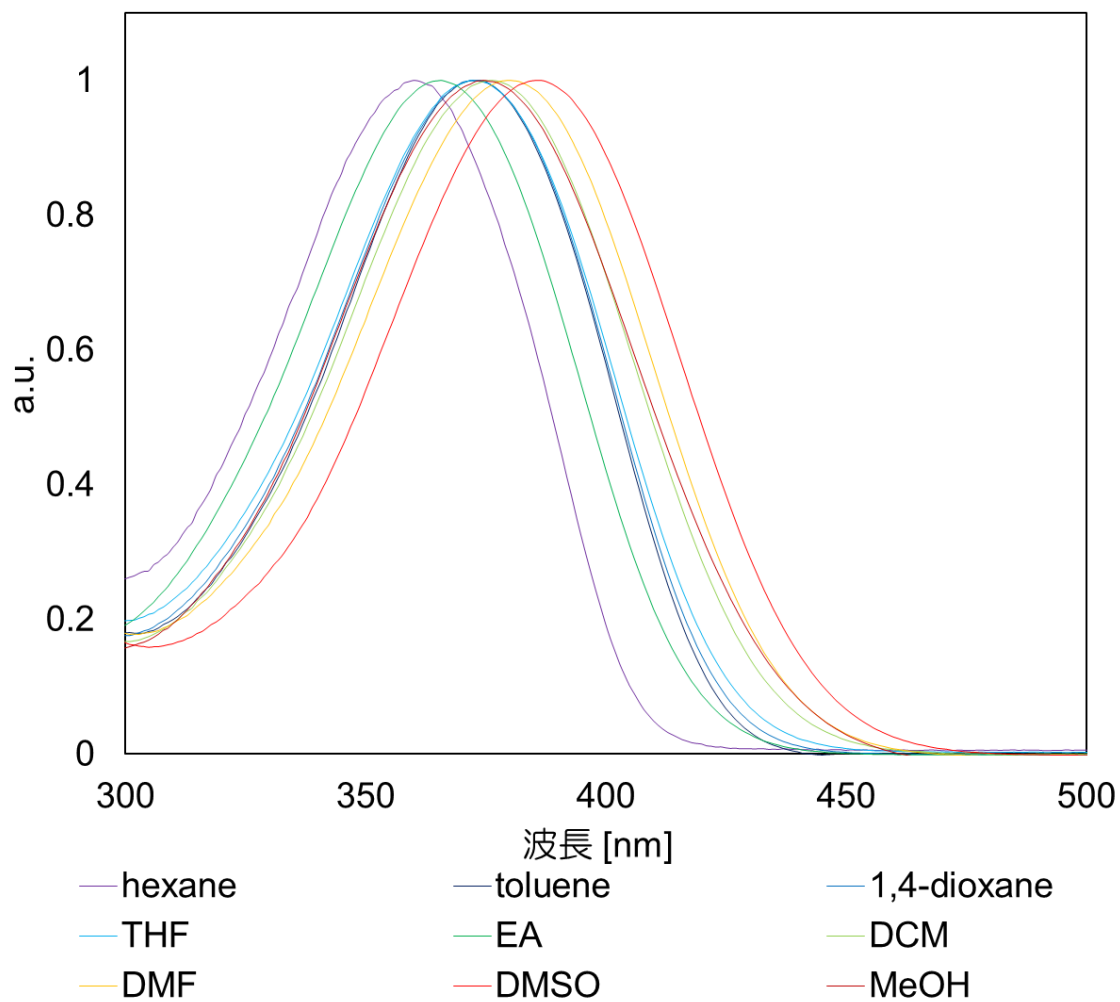


図 56. **12** の吸光スペクトル測定結果(ノーマライズ済)

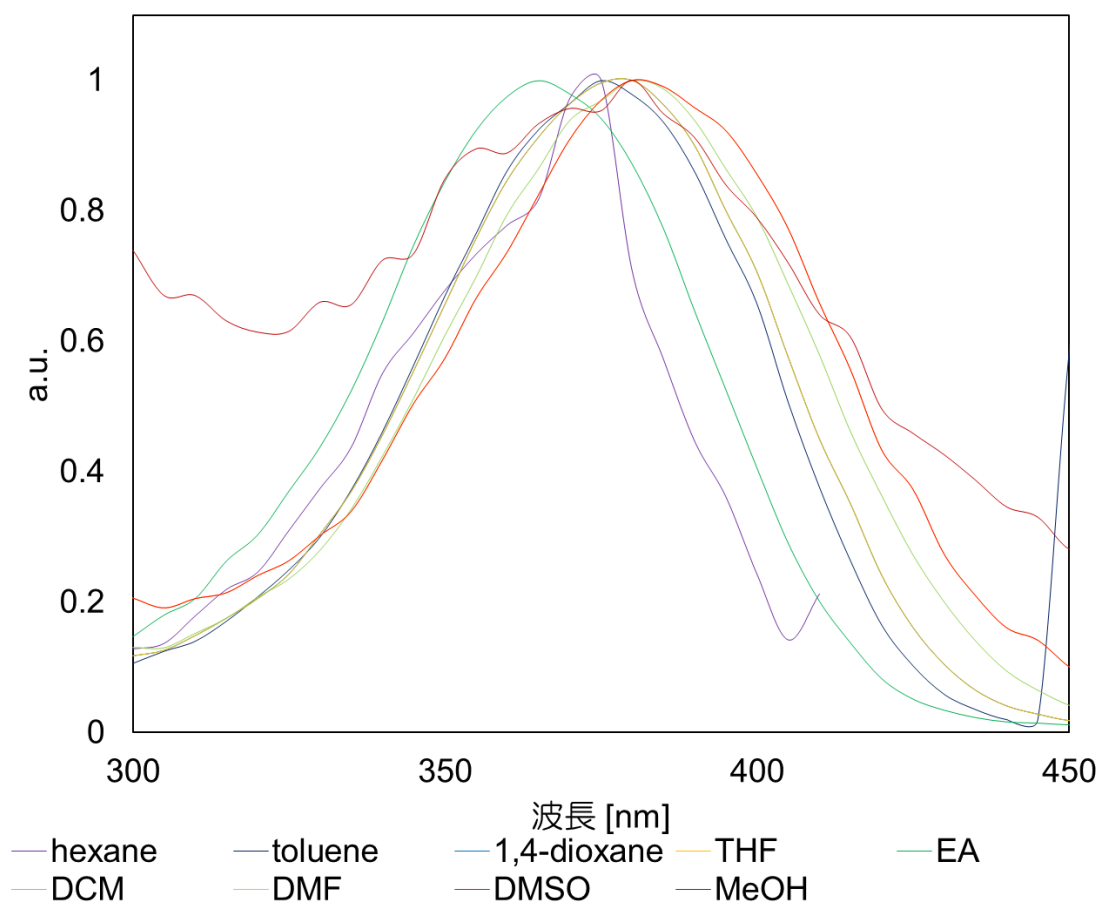


図 57. 12 の励起スペクトル測定結果(ノーマライズ済)

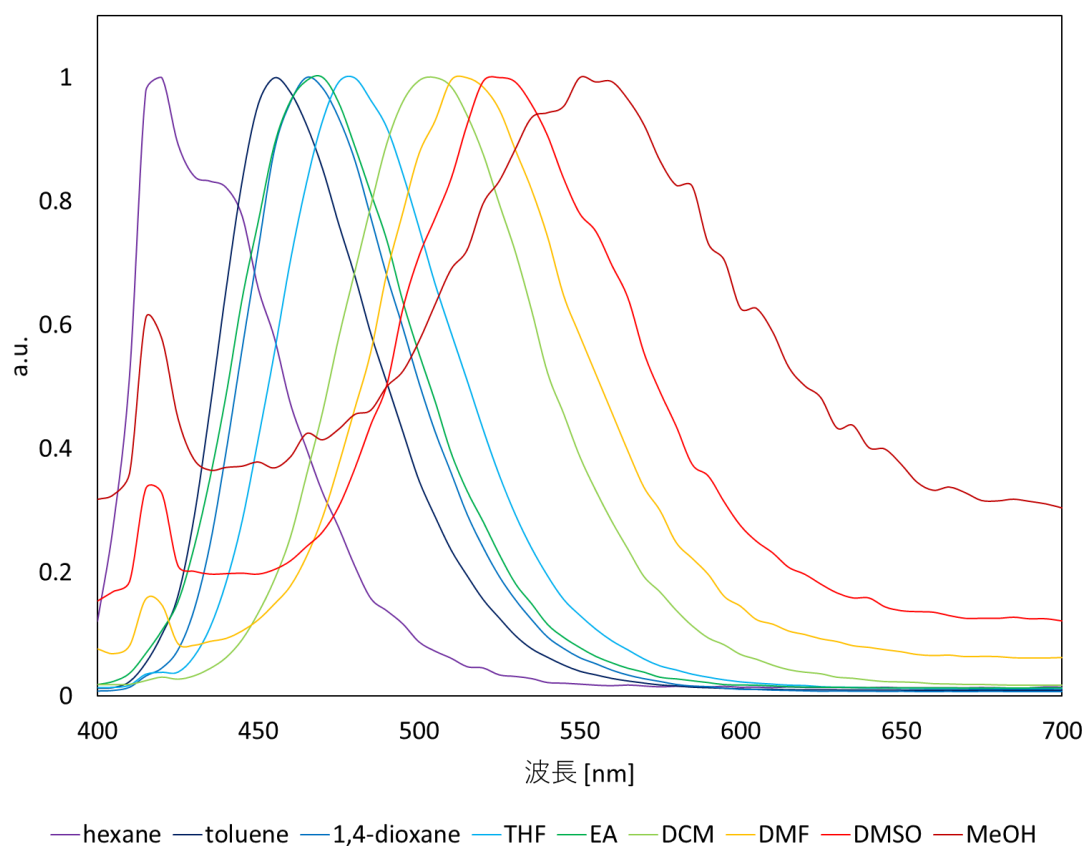


図 58. 12 の蛍光スペクトル測定結果(ノーマライズ済)

図 56～58 より、極性変化の影響で蛍光がより大きく変化していることがわかった。また、溶媒の実験的極性として知られている $E_T(30)$ を横軸に、吸光スペクトルと蛍光スペクトルの変化であるストークスシフトを縦軸にすると図 59 のようになる。

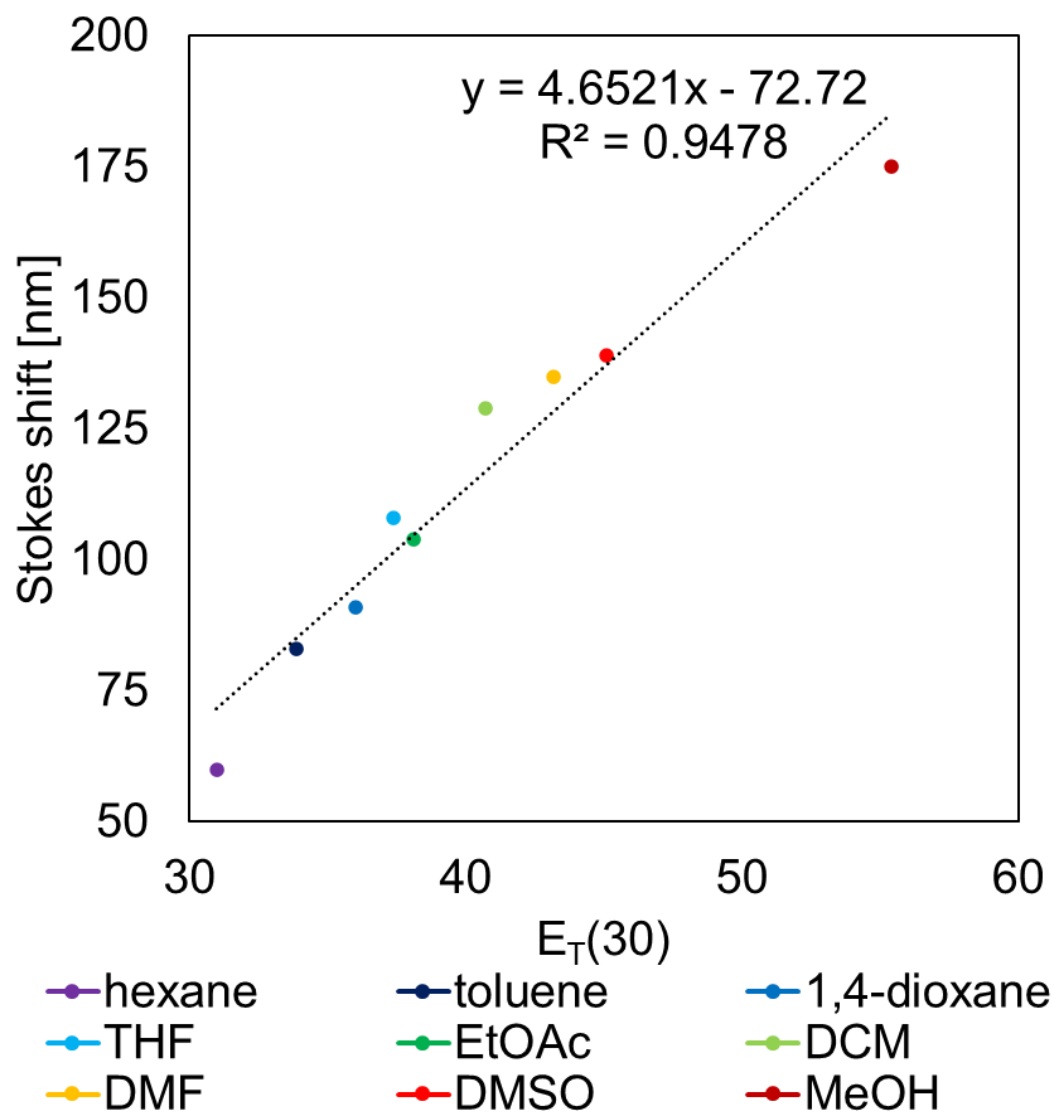


図 59. $E_T(30)$ とストークスシフトの関係

溶媒の極性変化に応じてストークスシフトが大きくなることがわかり、**12**が溶バトク
ロミズムの応答を示すことがわかった。

つぎに、**15a** を各種溶媒に加えて振盪して取り出した時の顕微鏡写真を図 60 に示す。また、その時の画像解析を行った結果を表 6 に示す。

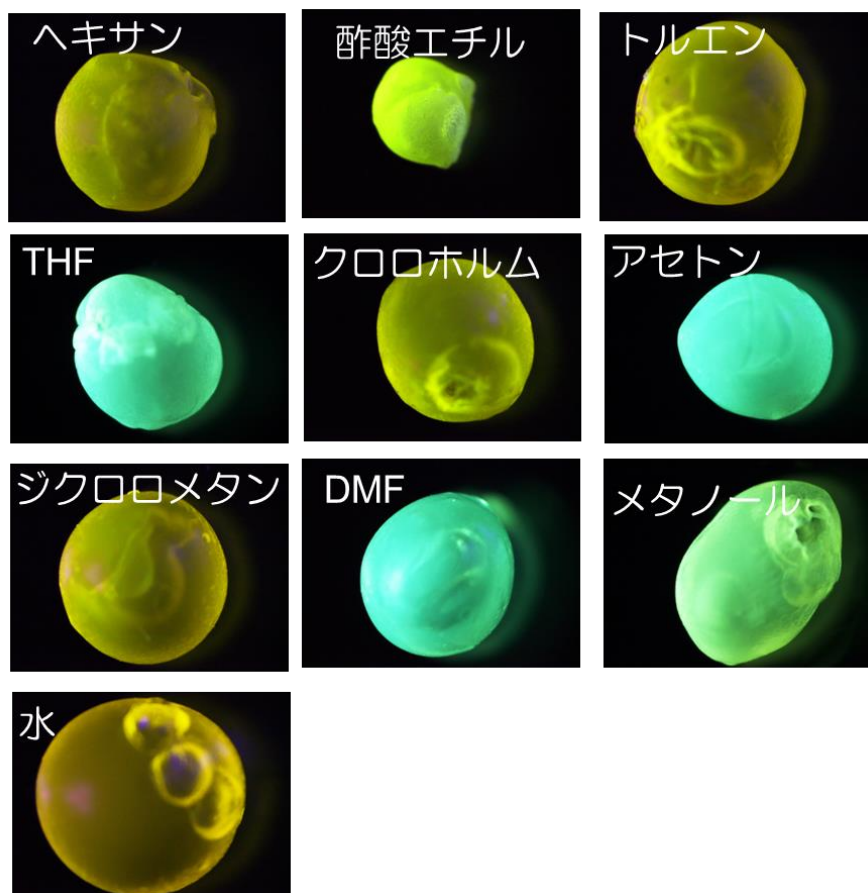


図 60. **15a** の各溶媒で振盪した後の様子

表 6. 図 60 を画像解析した結果と溶解度パラメーター及び水との混和性

溶媒の種類	δ : 溶解度パラメーター	Hue	水との混和
ヘキサン	7.3	42	×
酢酸エチル	8.6	53	×
トルエン	8.9	46	×
THF	9.1	105	○
クロロホルム	9.3	49	×
アセトン	9.4	110	○
ジクロロメタン	9.6	44	×
DMF	11.5	112	○
メタノール	12.9	89	○
水	21	36	○

得られた表 6 から、図 61 を得た。

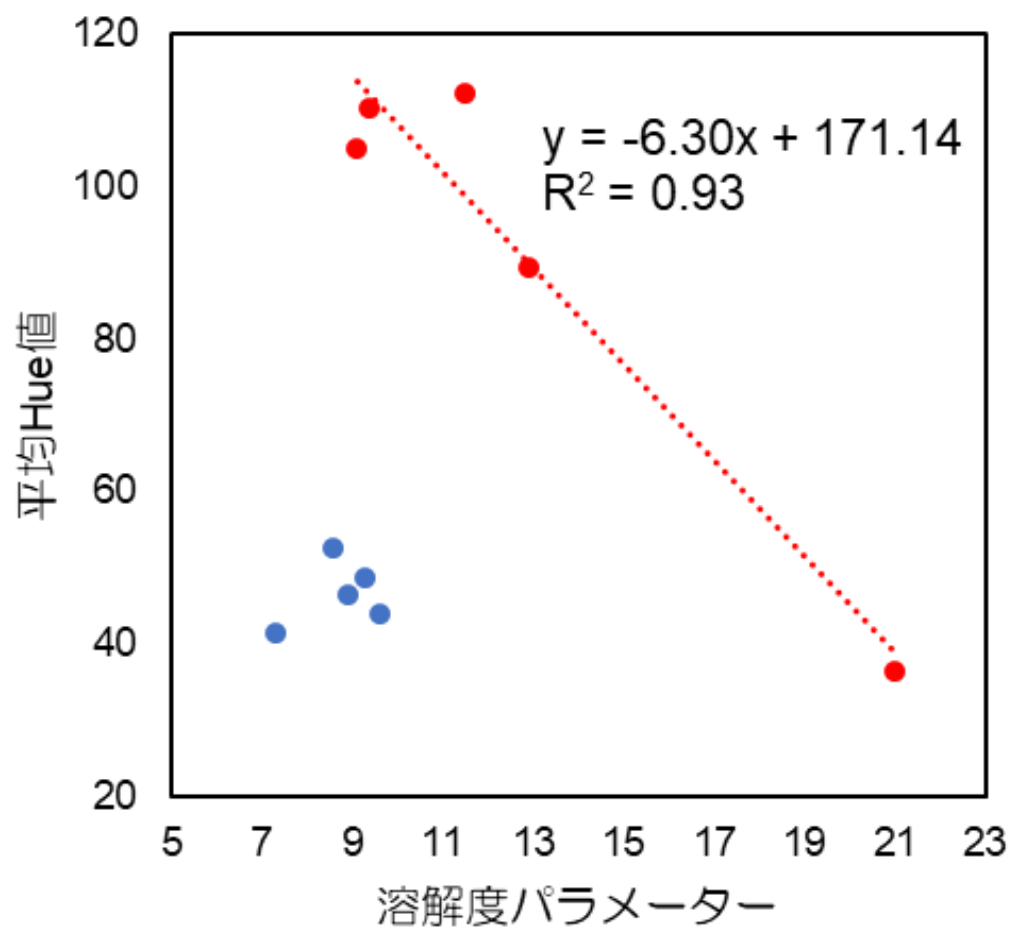


図 61. 15a の溶解度パラメーターと平均 Hue 値の関係

同様に 15b の結果を示す。

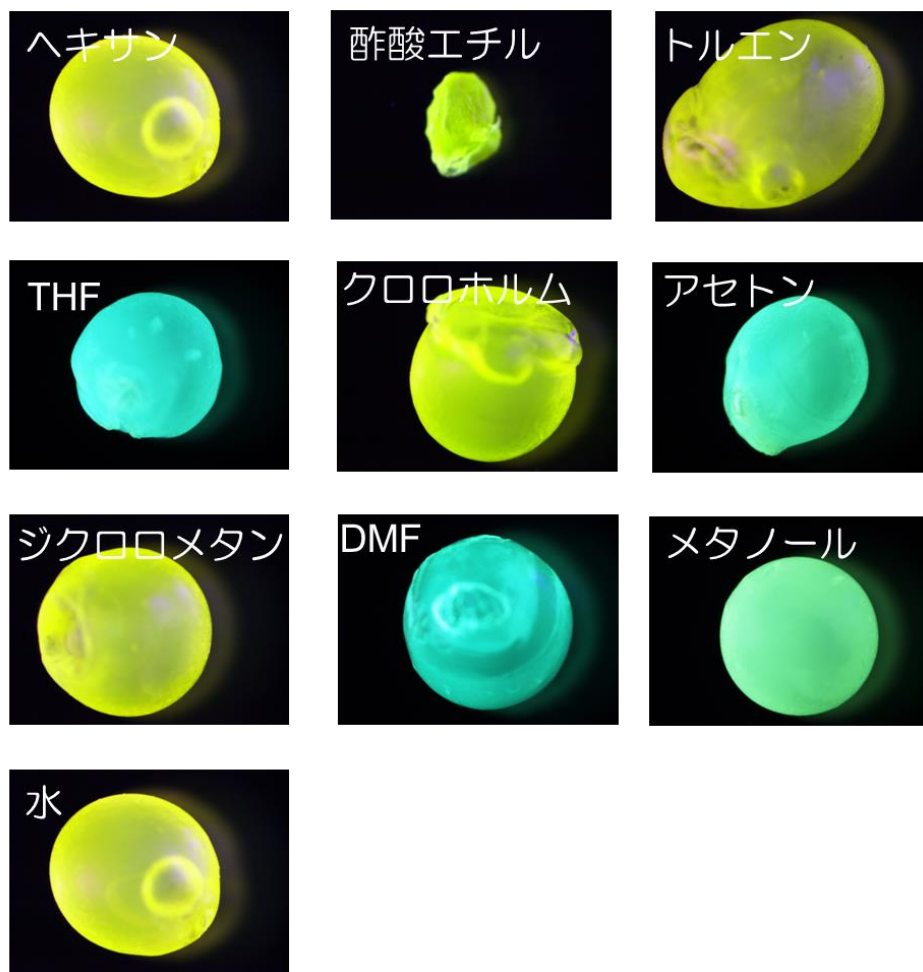


図 62. 15b の各溶媒で振盪した後の様子

表 7. 図 62 を画像解析した結果と溶解度パラメーター及び水との混和性

溶媒の種類	δ : 溶解度パラメーター	Hue	水との混和
ヘキサン	7.3	49	×
酢酸エチル	8.6	53	×
トルエン	8.9	47	×
THF	9.1	123	○
クロロホルム	9.3	54	×
アセトン	9.4	117	○
ジクロロメタン	9.6	51	×
DMF	11.5	121	○
メタノール	12.9	102	○
水	21	40	○

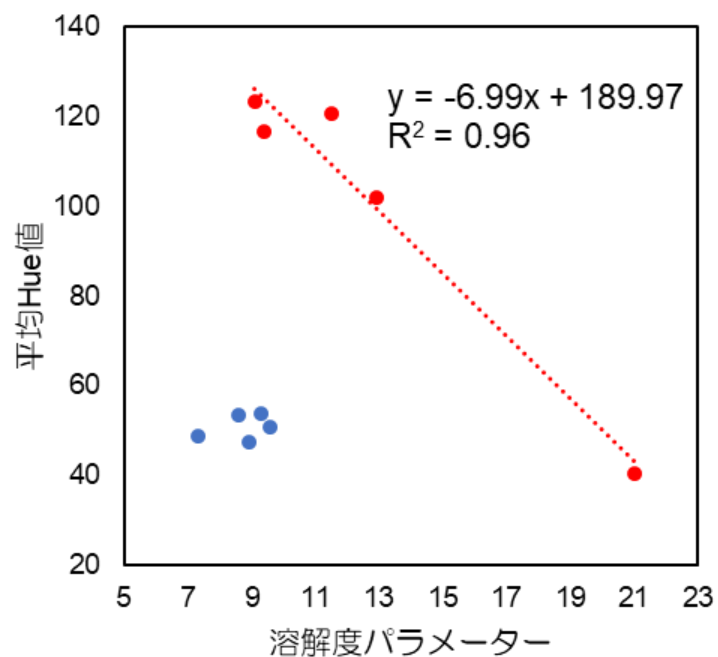


図 63. **15b** の溶解度パラメーターと平均 Hue 値の関係

図 61、63 の結果から、水と混和する有機溶媒の場合はアルギン酸ゲル中に存在している水と各有機溶媒が混ざり合い交換されることで色素周辺の極性が低極性に変化していくことで平均 Hue 値が増加していくと考えられる。つまり、水と混和しない有機溶媒の場合はアルギン酸ゲル内に水が残ることで平均 Hue 値がほぼ変化しない結果になったと予測される。

以上の結果から、定性的ではあるがゲルセンサー**15a,b** がソルバトクロミズムの特性を持つことを示せた。

3.5.3. CPC の CPC の時間依存吸着

ゲルセンサーが通常のアルギン酸と同様に CPC を吸着するか確認するために、CPC の時間吸着量を確認した結果を図 64～66 に示す。

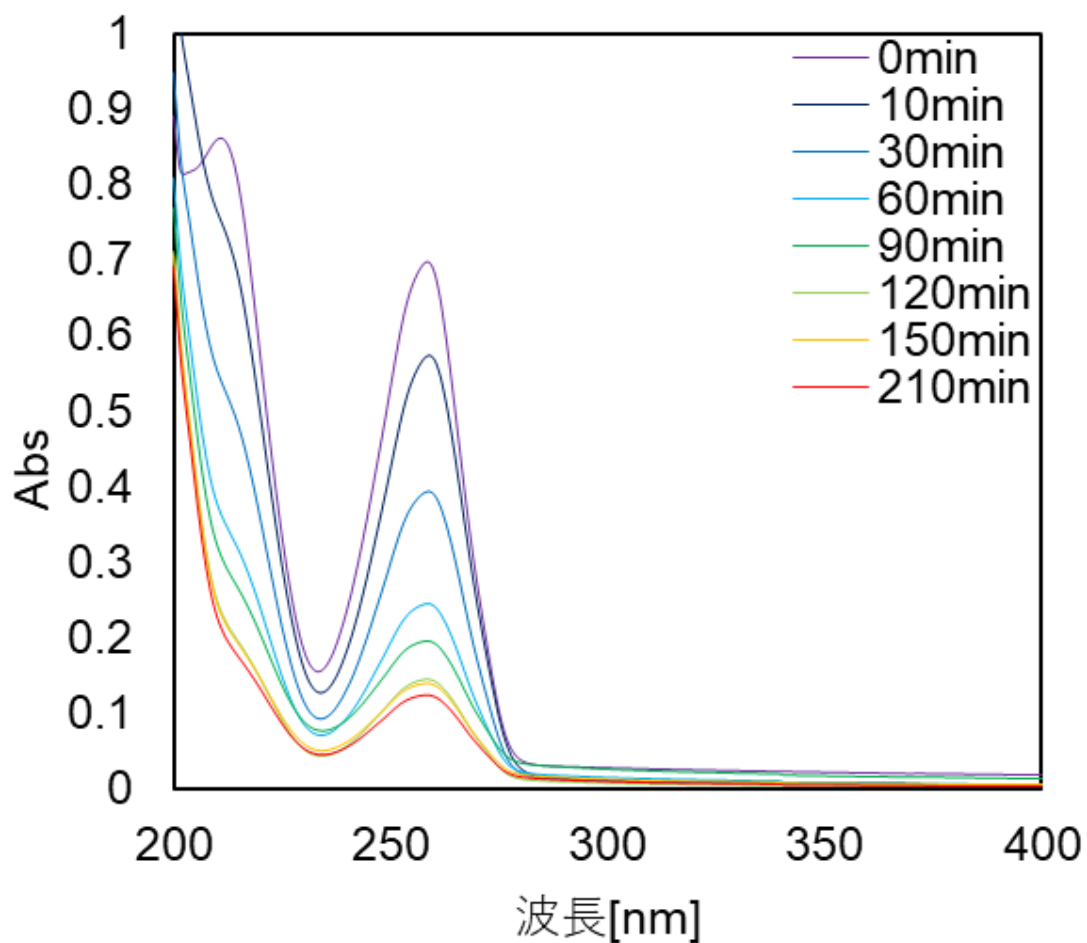


図 64. 14 を CPC 水溶液(200 μ M)に浸漬したときの吸収スペクトルの経時変化

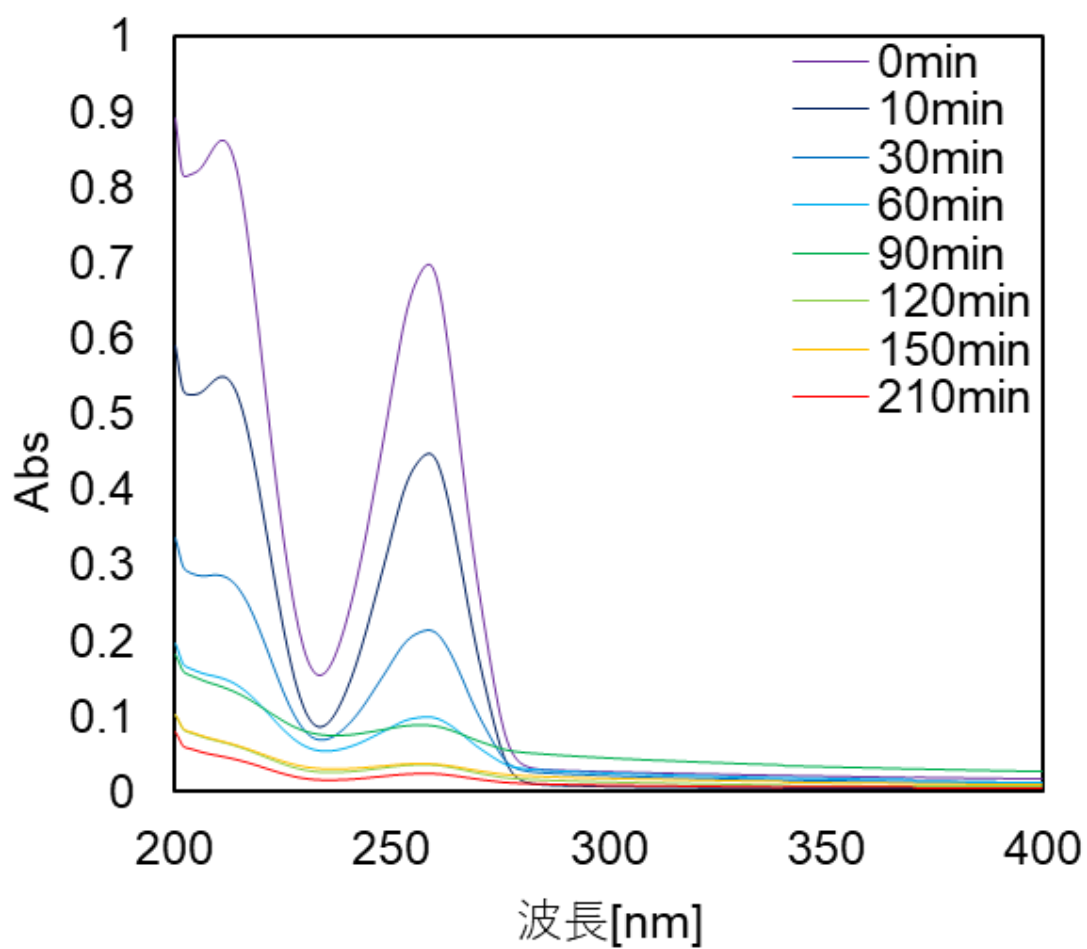


図 65. **15a** を CPC 水溶液(200 μ M)に浸漬したときの吸収スペクトルの経時変化

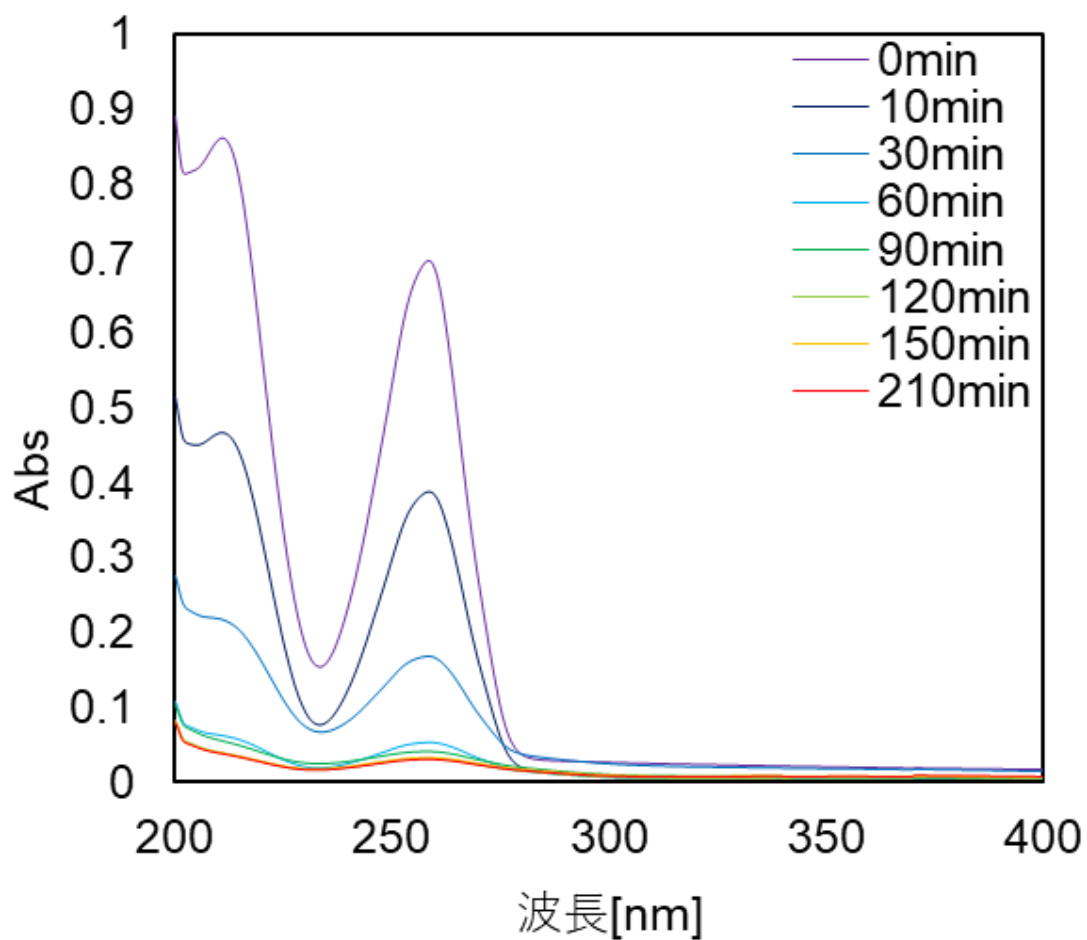


図 66. **15b** を CPC 水溶液($200\mu\text{M}$)に浸漬したときの吸収スペクトルの経時変化

図 64～66 より、ゲルセンサーは無修飾のアルギン酸ゲルビーズと同様の働きがあることが分かった。その吸着量がどのように変化するかを確認することとした。

図 64～66 と **14** 及び **15a,b** の平均重量から図 67 のような結果を得た。

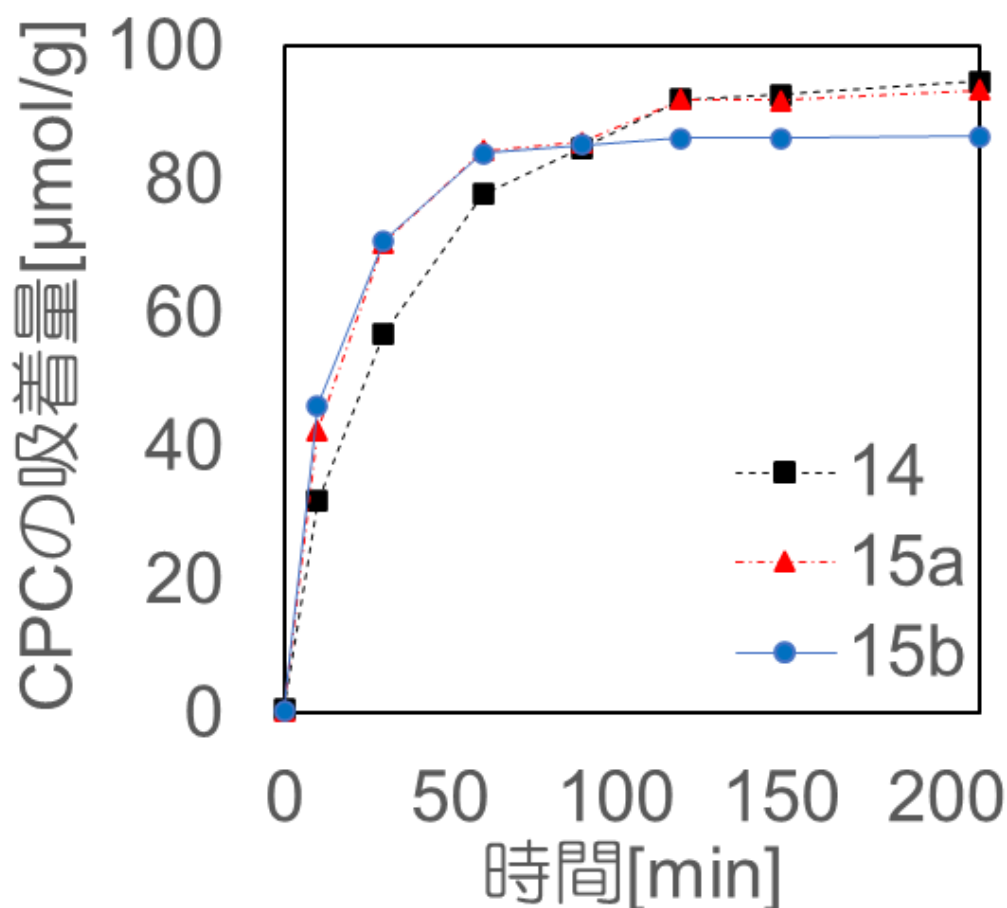


図 67. 14 及び 15a、b の CPC の時間依存吸着量
(CPC の最大吸収波長である 255 nm から算出)

図 67.より、0～90 分の範囲の中では CPC 吸着量が **14** の方が **15a,b** よりも大きい（差は最大 15 $\mu\text{mol/g}$ 程度になる）ことが分かった。この違いは、CPC がビーズ中のクーロン力によってカルボキシ基（この場合は、クーロン力がよく働く $-\text{COO}^-$ の状態）に近づく可能性が高かったことが関係していると考えられる。

つまり、本研究では水と DMF の混合溶液を用いてゲルセンサーを作製した。そのため、アルギン酸ビーズが DMF の疎水作用によりただの水溶液で作成するよりも膨潤している可能性がある（水中では **14** の平均直径が 4.0 mm であったが混合溶液では 4.3 mm であったため）。そのうえで、アルギン酸ビーズは蛍光ソルバトクロミック色素が疎水性であるために、DMF を洗浄で除去しても膨潤したままになる可能性がある。このため、CPC が単純なアルギン酸ビーズよりも容易に内部のカルボキシ基（特に $-\text{COO}^-$ ）に到達すると考えられ、初期段階での速度が速かったと考えられる。

また、**15b** が吸着する CPC 量は、それぞれ **14** および **15a** よりも 41 $\mu\text{mol/g}$ および 34 $\mu\text{mol/g}$ 低くなった。この差は、**15b** のカルボキシ基の数が蛍光ソルバトクロミック色素

と多く結合することで少なくなる結果であると考えられる。

3.5.4 CPC の静置吸着

次に、ゲルセンサーの色変化を確認するために **15a** 及び **15b** を用いた静置した状態での CPC 吸着実験を行った。その時のゲルセンサーを図 68、69 に示す。

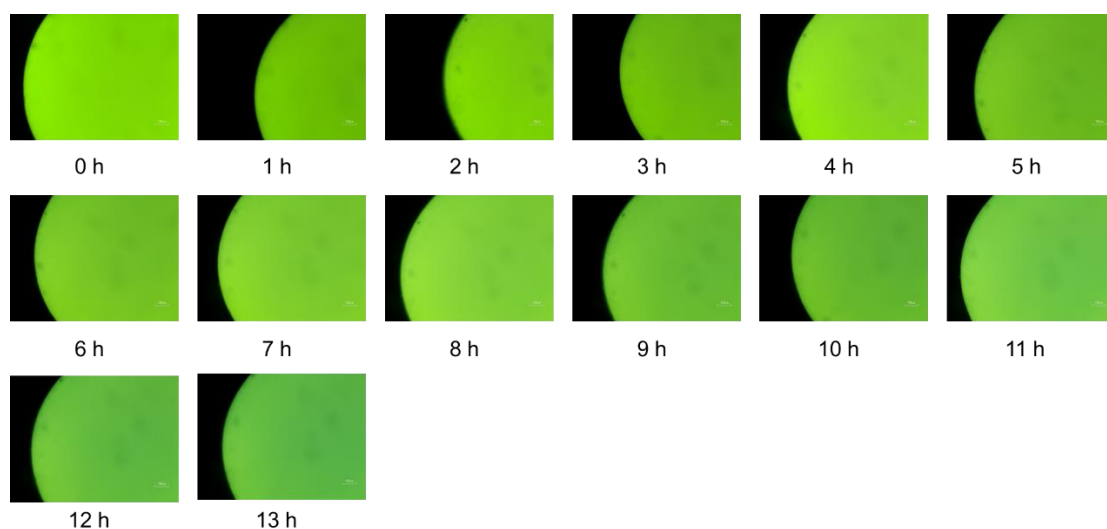


図 68. **15a** の各時間における蛍光顕微鏡画像

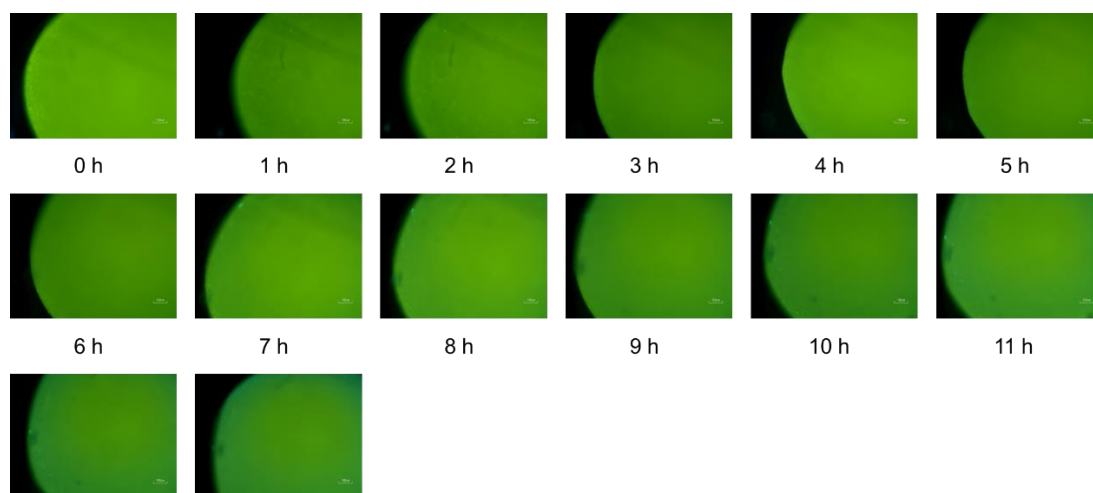


図 69. **15b** の各時間における蛍光顕微鏡画像

また、図 70 には **15a** を用いて吸光度がどのように変化したかを示す。

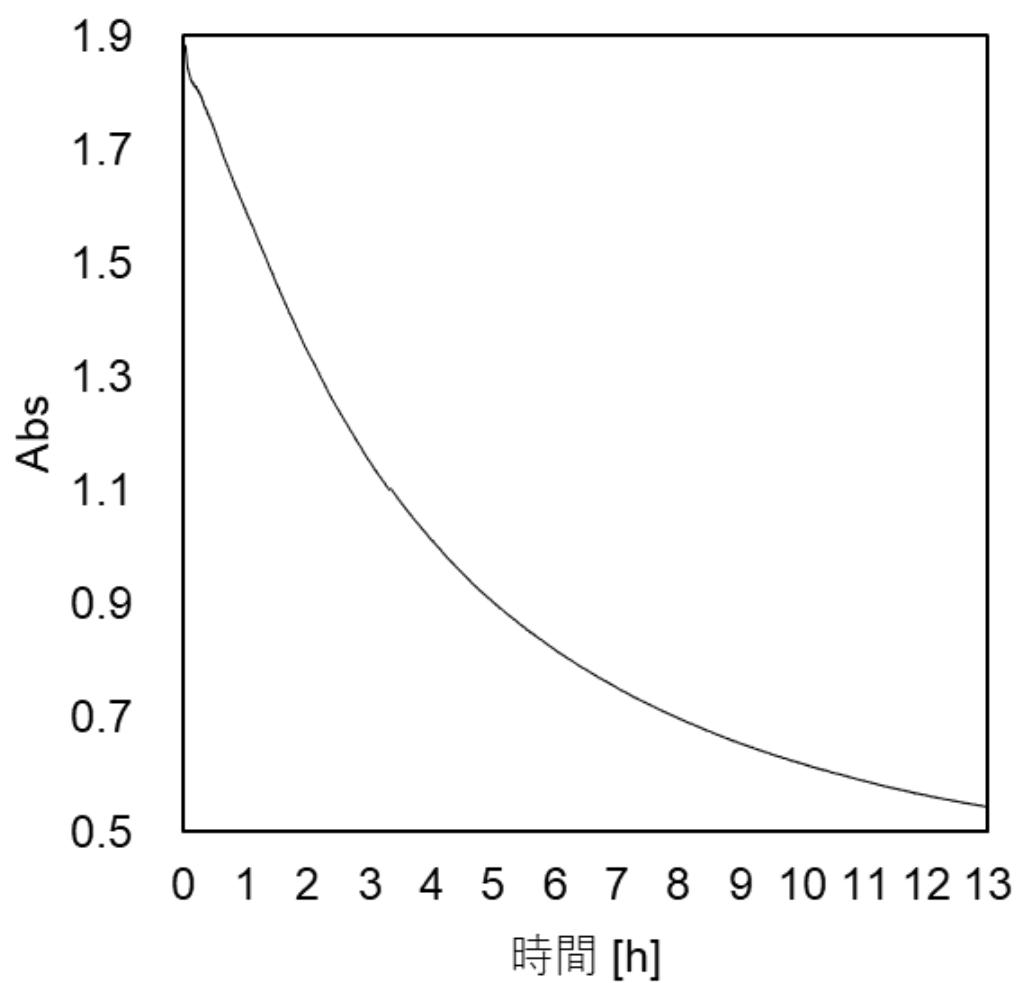


図 70. **15a**(10 ビーズ)を含む CPC 水溶液 (400 μM) の吸光度 (255 nm) の経時変化

次に、**15a,b** の静置した状態での平均 Hue 値の経時変化を図 71 に示す。

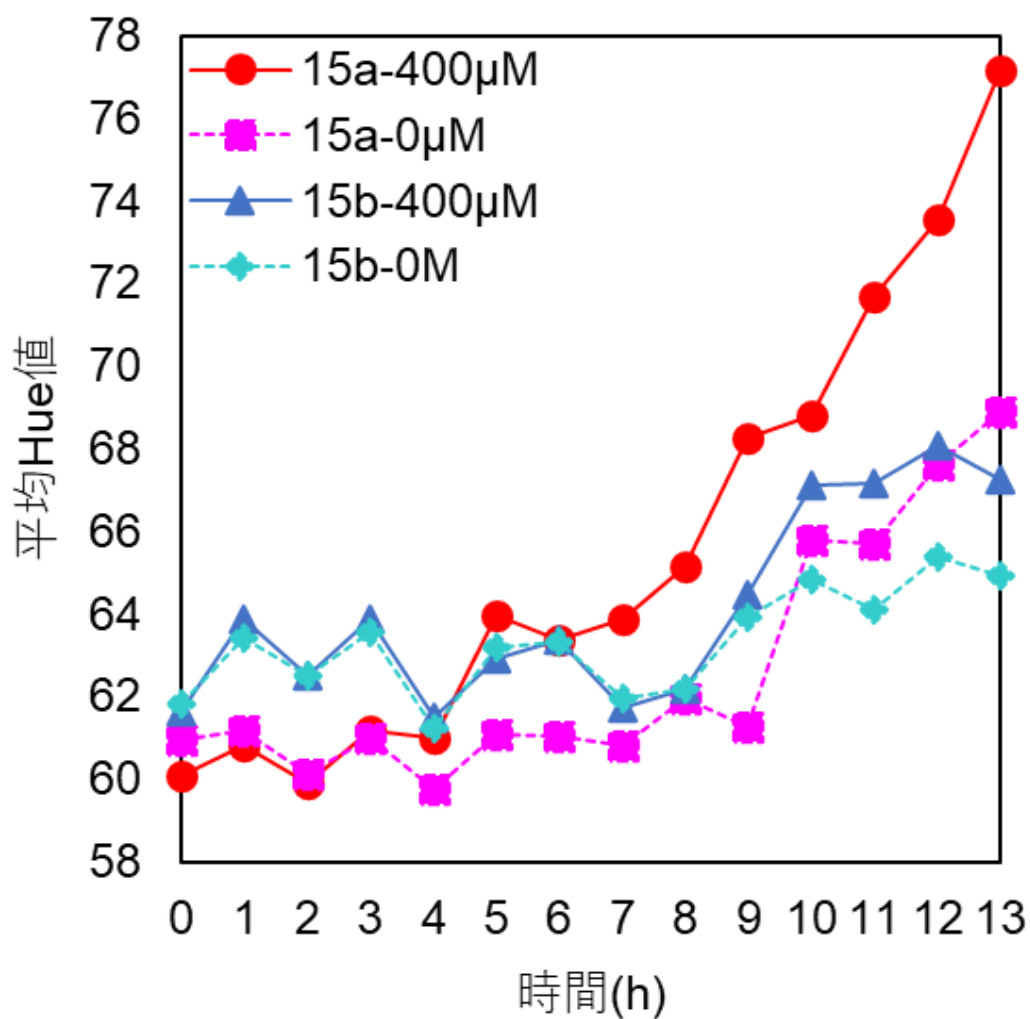


図 71. 静置した状態における **15a** 及び **15b** の平均 Hue 値の経時変化

図 70 から、ゲルセンサーが静置した状態で CPC を吸着する場合には 13 時間程度かかることが分かった。さらに図 71 から CPC を吸着することで蛍光色がライム色[Hue = 62](約 580 nm)から緑黄色[Hue = 78](約 540 nm)に変化することを確認できた。ここで、CPC を添加していない場合でも蛍光色に変化していることが観測された。この理由としては、ゲルセンサーが球形であるため、倒立型蛍光顕微鏡で撮影する場合、下から励起光が届くために球の厚さの分だけで誤差が出ていると考えられる。このため、次の濃度依存吸着に関する実験では、光源をカメラと垂直にした状態で正立型顕微鏡を使用して実験を行った。

3.5.5. CPC の濃度依存的吸着と性能比較

15a,b からの発光が CPC に定量的に応答することを実証するために、様々な濃度の CPC の存在下で、これらのゲルセンサーの Hue 値を決定する実験を行った。

結果のデータを表 8.および図 72～74 に示す。

表 8. 異なる濃度の CPC を含む水溶液中の **15a,b** の色相値

水溶液中の CPC 濃度 [μM]	0	10	20	50	80	100	500	800	1000
Hue 値の平均	15a 46.39	46.36	48.26	49.37	49.61	49.86	58.07	60.79	63.14
	15b 46.65	47.89	48.75	48.94	48.94	53.47	59.12	59.19	62.01

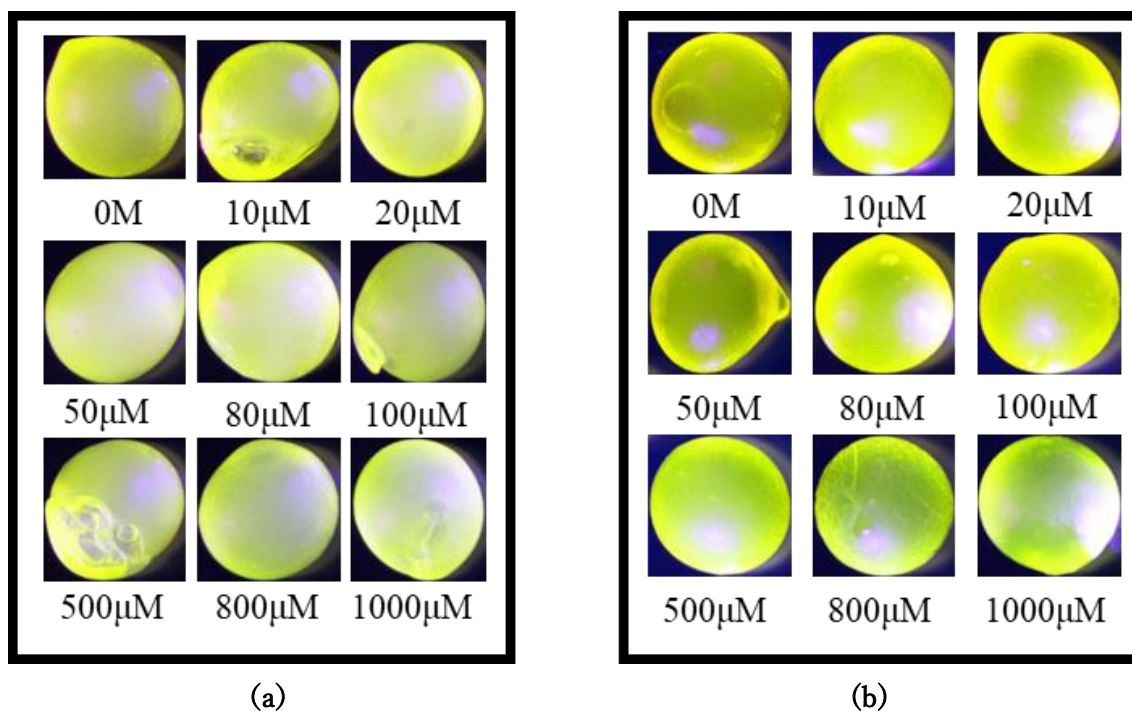


図 72. ゲルセンサーの紫外線照射下の状態[(a)**15a**、(b)**15b**]

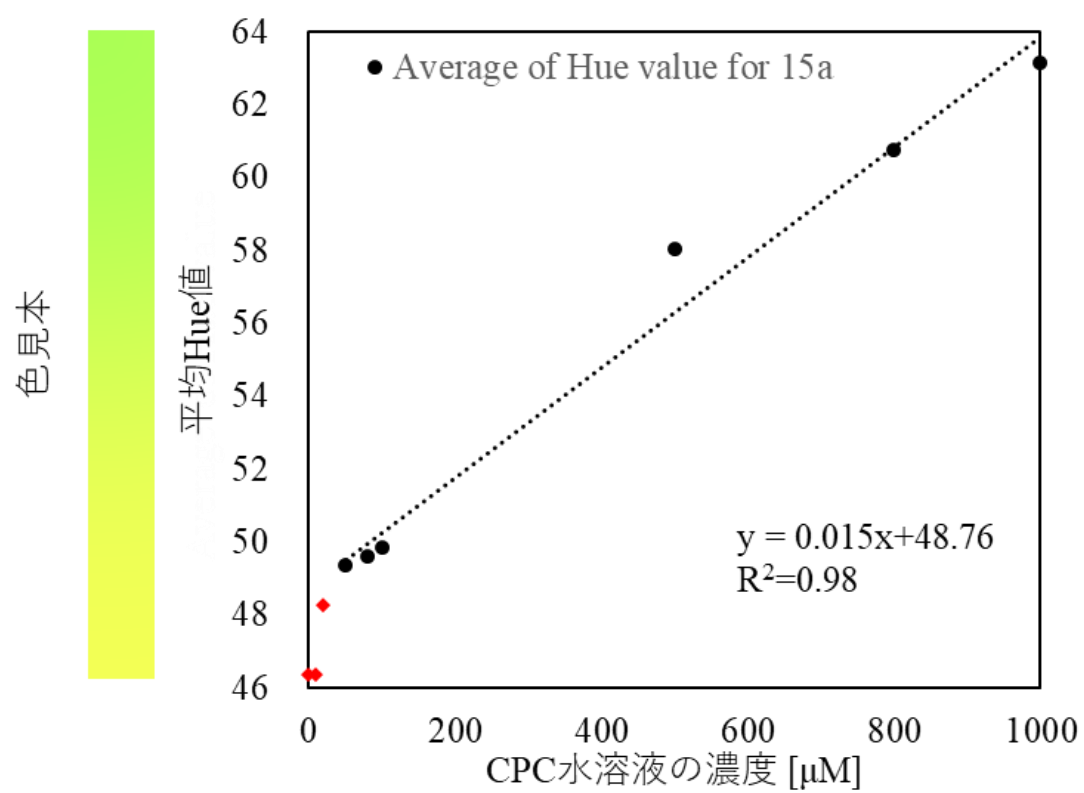


図 73. CPC 濃度に対する **15a** の平均 Hue 値のプロット
但し、◆は近似直線には含まれない。

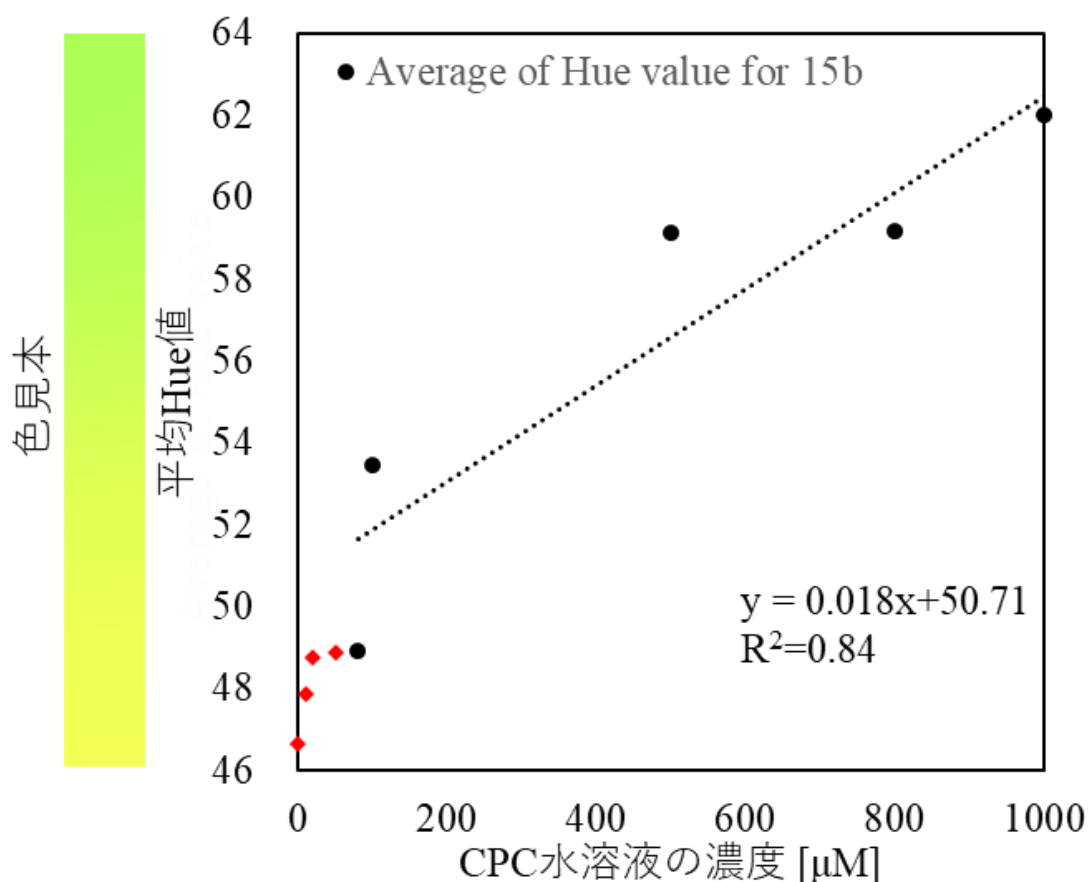


図 74. CPC 濃度に対する **15b** の平均 Hue 値のプロット
但し、◆は近似直線には含まれない。

図 73 および図 74 から、ゲルセンサー**15a,b**は水溶液中の CPC 濃度が増加するとともに、Hue 値が約 62～63 の値に増加することが分かった。

同時に、蛍光溶バトクロミック色素の蛍光発光色はライム色(約 580nm)から緑黄色(約 540nm)に変化し、波長極大がブルーシフトしている。この色変化は、静置した状態でのゲルセンサーと同様の变化であることが分かった。

これら両方の現象は、共有結合した蛍光溶バトクロミック色素を取り巻く環境の極性が低下された場合に引き起こされていると考えられることから、ゲルセンサーへ CPC が吸着された結果である可能性が高いと言える。

また、界面活性剤濃度と Hue 値との間に相関関係が存在することは、**15a,b** が CPC にとって良好なセンサーであることを示している。CPC の CMC は 900 μM 程度であることから、水溶液中にミセルが存在しない低濃度領域の場合でも、**15a,b** は CPC 濃度に定量的に応答することが示唆された[54]。

しかし、図 73 及び図 74 からは CPC 水溶液の低濃度(0-50 μM)と高濃度(80 μM-)の間で吸着機構に変化があると考えられる。つまり、低濃度では、CPC 分子は静電相互作用に

よりアルギン酸のカルボキシ基に近づく。そして蛍光ソルバトクロミック色素が導入されたカルボキシ基が近傍に存在する場合、蛍光波長に応答する。

一方、高濃度では、ビーズ中の CPC 濃度が増加し、より多くの CPC のミセルが発生する。これにより、ミセルに取り込まれる蛍光色素の量が増えたため、量的な変化が見られたと考えられる。(図 75)

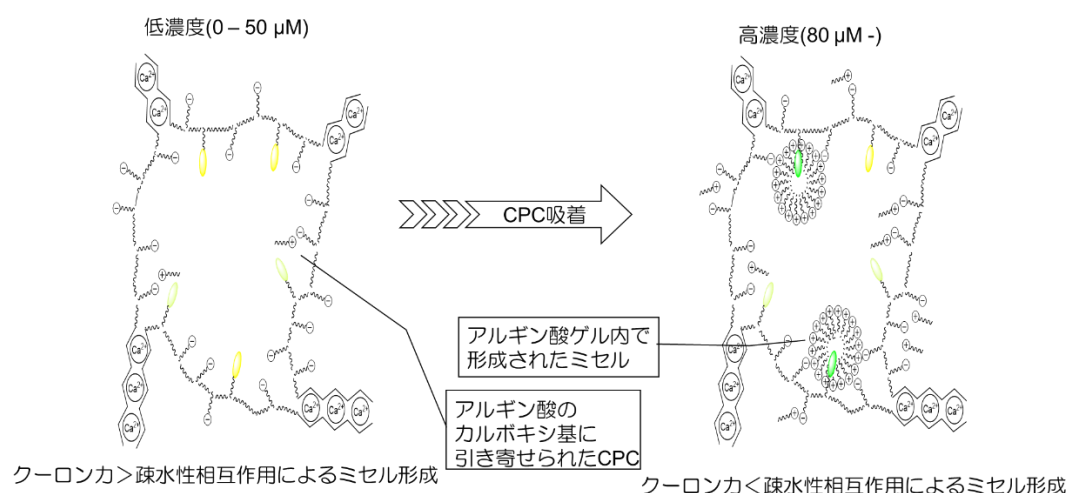
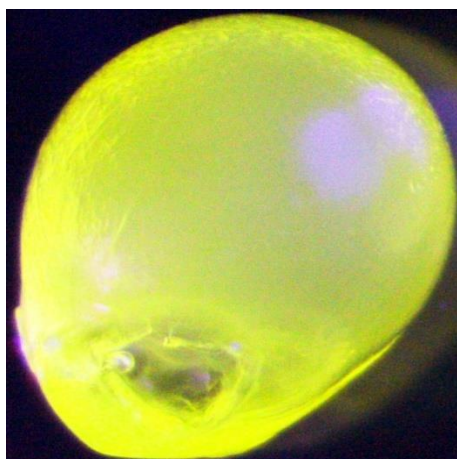
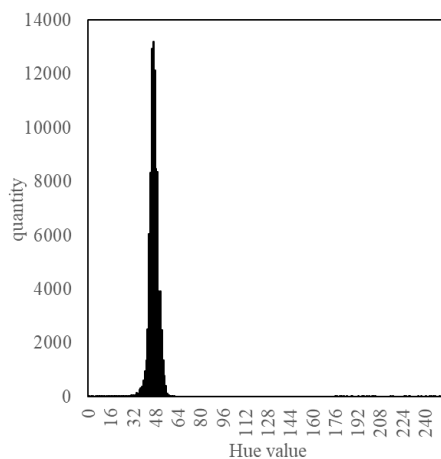


図 75. ゲルセンサーに対する CPC の吸着挙動の予測図

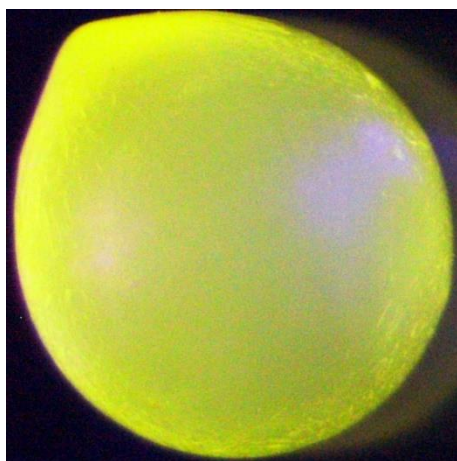
次に、**15a** と **15b** の標準偏差と定量下限を確認するために、それぞれのビーズの CPC を含まない溶液に同様に保存したビーズを 3 つ取り出し、それぞれ画像解析したものを、図 76、77 に示す。



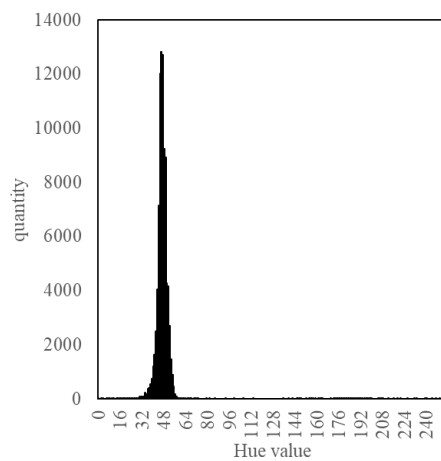
(a)



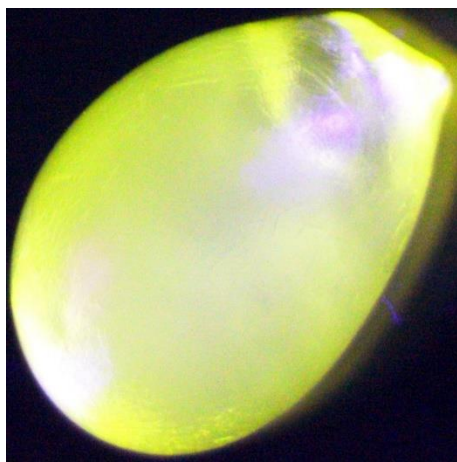
(b)



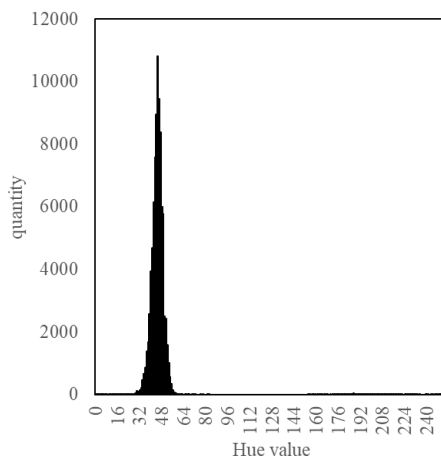
(c)



(d)

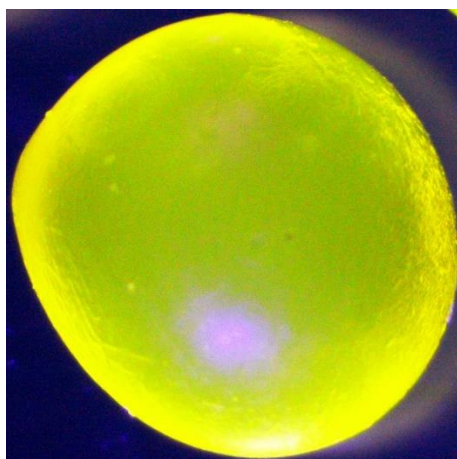


(e)

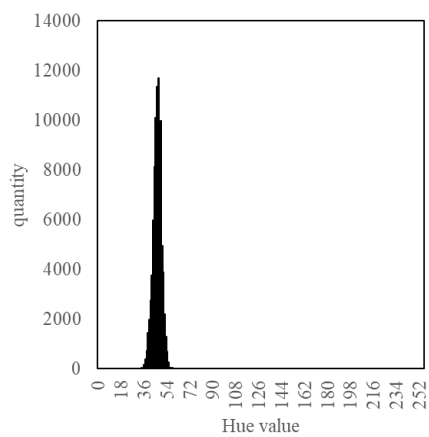


(f)

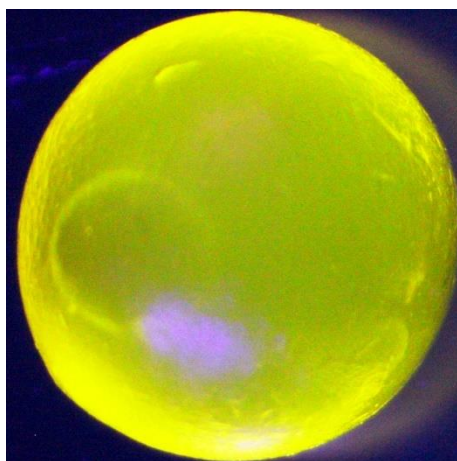
図 76. ビーズ 15a(3 個)の蛍光画像(a)、(c)、(e)からそれぞれ Hue ヒストグラム(b)、(d)、(f)を作成した。



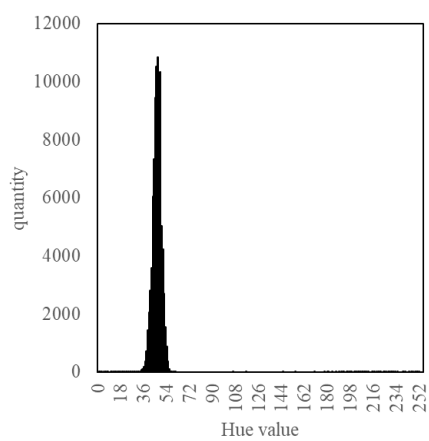
(a)



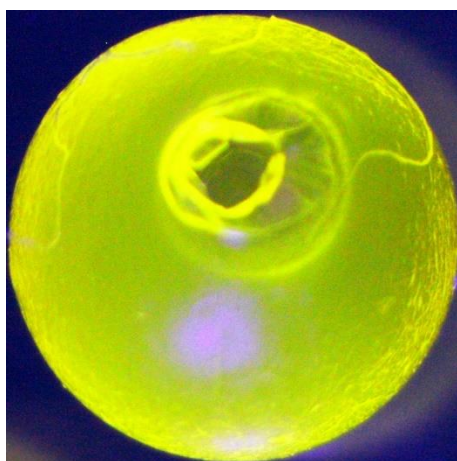
(b)



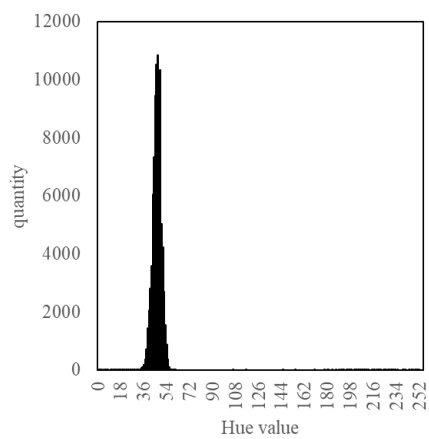
(c)



(d)



(e)



(f)

図 77. ビーズ 15b(3 個)の蛍光画像(a)、(c)、(e)からそれぞれ Hue ヒストグラム(b)、(d)、(f)を作成した。

図 73、74、76、77 から、**15a** の標準偏差は 0.23、**15b** の標準偏差は 0.36 である。さらに、0~50 μM の範囲のこれらのプロットの傾きを使用して、CPC 濃度の定量下限がそれぞれ **15a** で 0.035 μM 、**15b** で 0.068 μM であることがわかった。

また、平衡状態に達するまでについては、振とうした状態での測定では 2 時間であったが、静置した状態での測定では平衡に達するまでに 13 時間を要した。

さらに、振とうしている状態での残った CPC 濃度の検量線を基に作成したものを図 78 と表 9 に示す。

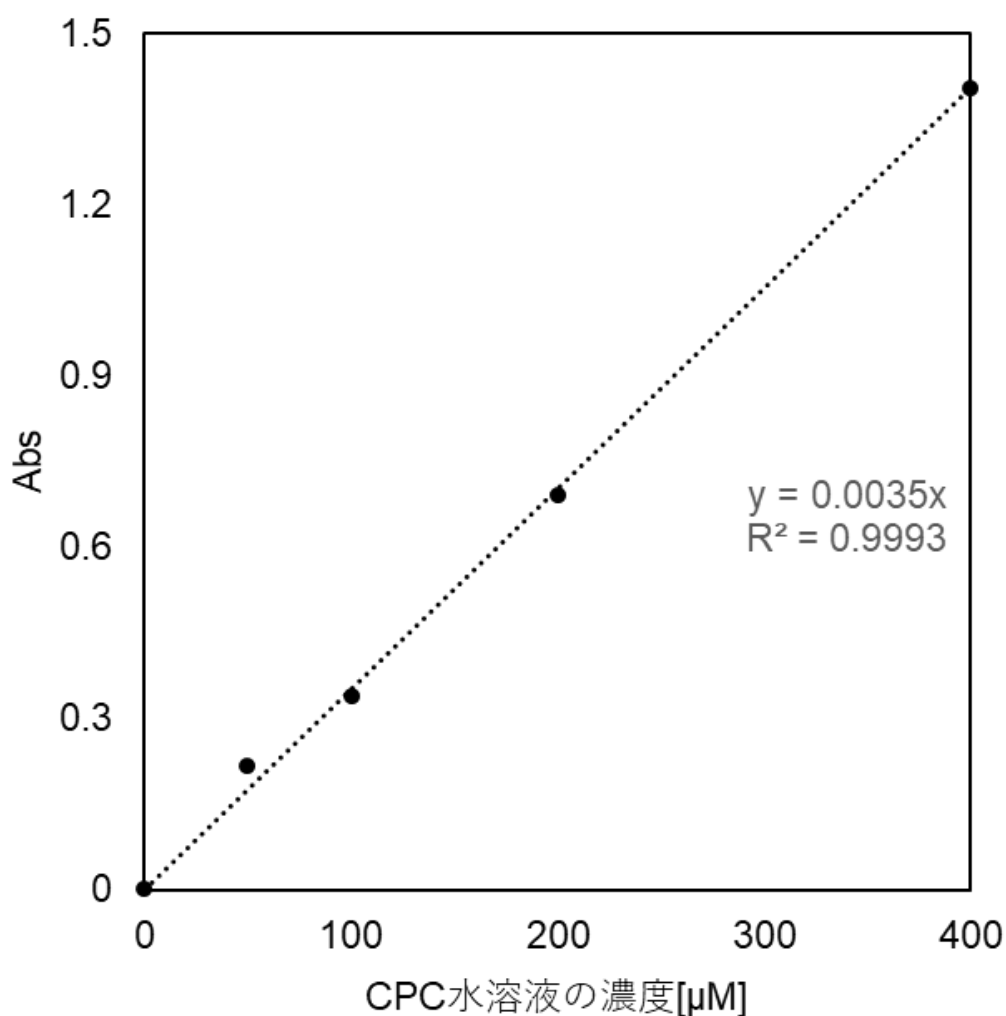


図 78. 0~400 μM における検量線

表 9. 検量線を基にした 15a,b の吸着した溶液の吸光度とその算出した CPC 濃度

水溶液中の 初期 CPC 濃度 [μM]		0	80	100	500	800	1000
吸光度	15a	0.00060	0.00060	0.00070	0.00070	0.00060	0.00070
	15b	0.00060	0.00060	0.00060	0.00070	0.00070	0.00070
水溶液中の最終 CPC 濃度[μM]	15a	0.17	0.17	0.20	0.20	0.17	0.20
	15b	0.17	0.17	0.17	0.20	0.20	0.20

表 9 より 1000 μM の濃度まではほぼ全ての CPC が水溶液から除去されたが、静置した状態では約 64 μM の溶液中に CPC が残ることが分かった。これらから、機械的強度の強いアルギン酸ゲルを用いるので、このシステムで作製したゲルセンサーを用いる場合には振とう型を用いる方が利点を有する。

次に、CPC 吸着量と 15a,b の平均色相値との関係を求めたものを図 79 に示す。

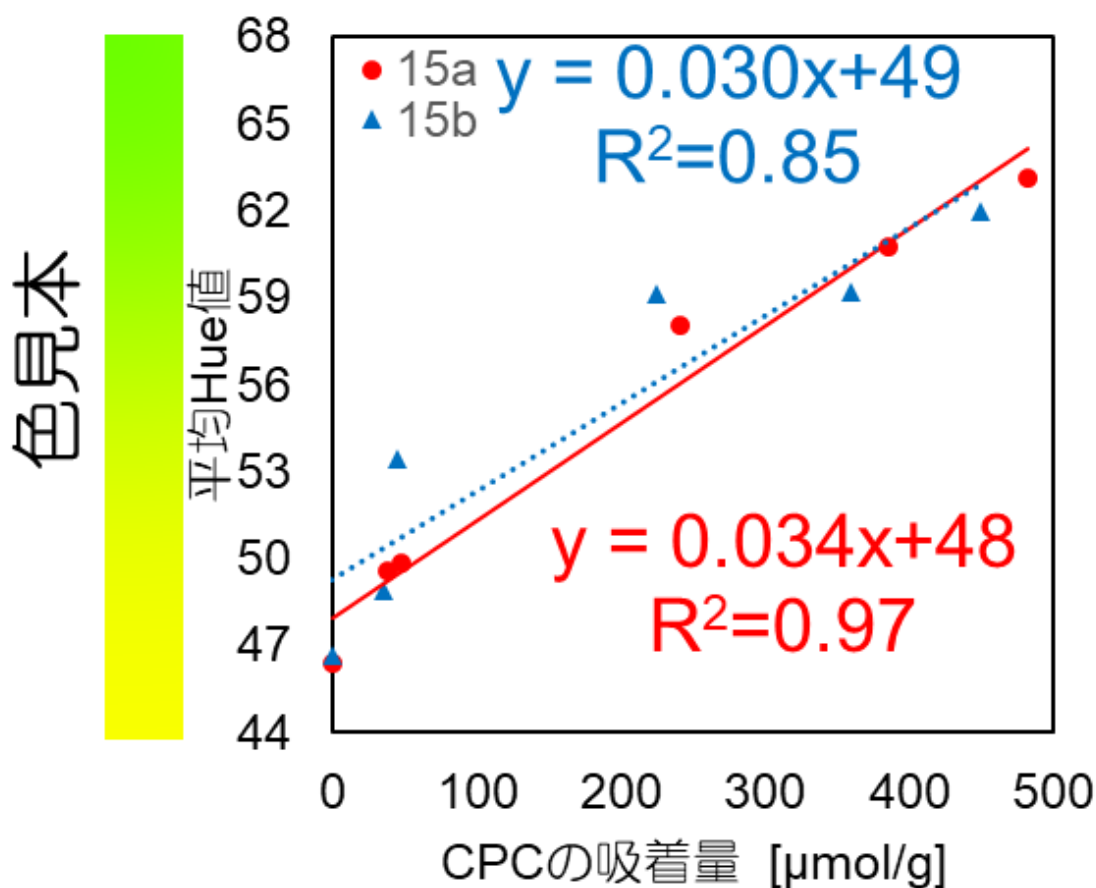


図 79. 平均 Hue 値および CPC 吸着量の関係
(赤 : 15a、青 : 15b)

図 79.より、吸着量 0-500 $\mu\text{mol/g}$ の範囲には一定の相関関係があり、吸収量の定量測定が可能であることが示された。また特に **15a** は **15b** と比較して、より正確な定量が可能であり、なおかつ定量下限もより低いセンシングが可能であることがわかった。

次に、**15a** を参照論文[55~57]と比較したものを表 10 に示す。

表 10. 画像解析を用いたアルギン酸ビーズ混合物の比較。

	ビーズ成分(主成分)	M ²⁺ 添加量	目的物	検出方法	検出範囲 [mM]	検出下限 [μM]	R ²
	アルギン酸塩— 15a 蛍光ソルバトクロミック色 素	塩化カルシウム (0.9 [M])	界面活性剤	画像解析 (蛍光)	0.070~1.0	70	0.97
[55]	アルギン酸塩— 乳酸オキシダーゼ	塩化カルシウム (400 [mM])	乳酸	画像解析 (吸光)	10~100	6400	0.99
[56]	アルギン酸メチルセルロー ス— ブロモチモルブルー	塩化カルシウム (0.9 [M])	全揮発性塩 基性窒素	画像解析 (吸光)	344~880	3.4 × 10 ⁵	0.98
[57]	アルギン酸塩— TiO ₂ ナノチューブ	TiO ₂ — ナノチューブ	乳酸	画像解析 (吸光)	0.10~1.0	230	0.98
		(5 [mg])	グルコース		0.10~0.80	150	0.99

表 10 より、蛍光を用いた本研究における定量下限は、吸光を用いた比色画像解析を使用する 3 つの参考文献[53~55]に記載されている他のセンサーよりも低いことが示された。この違いは、蛍光が吸光を用いた比色法よりも検出可能性が高い傾向があることによるものと考えられる。また、環境に排出される CPC の水中での慢性毒性は 0.56 mM であるため、検出濃度範囲が 0.035~1.0 mM の蛍光ビーズセンサーが適用可能である[58]。

3.5.5. CPC の濃度依存的吸着と性能比較

15a の CPC、CTAB、Toriton-X、DBS の吸着に関する画像解析の結果を図 80～83 に示す。

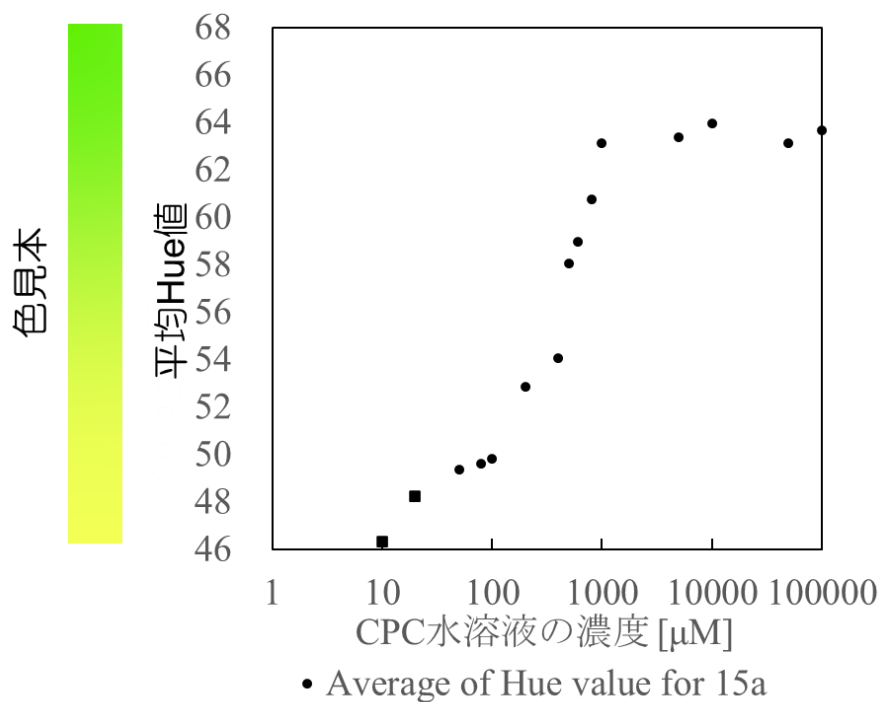


図 80. CPC の高濃度領域を含む吸着時の平均 Hue 値とその時の水溶液濃度

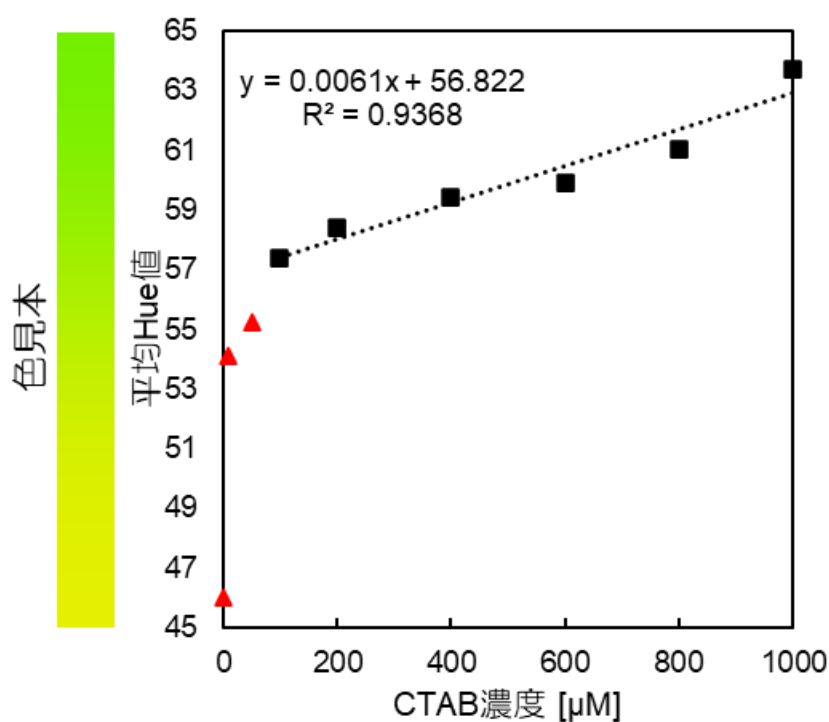


図 81. CTAB の吸着時の平均 Hue 値とその時の水溶液濃度
但し、▲は近似直線には含まれない。

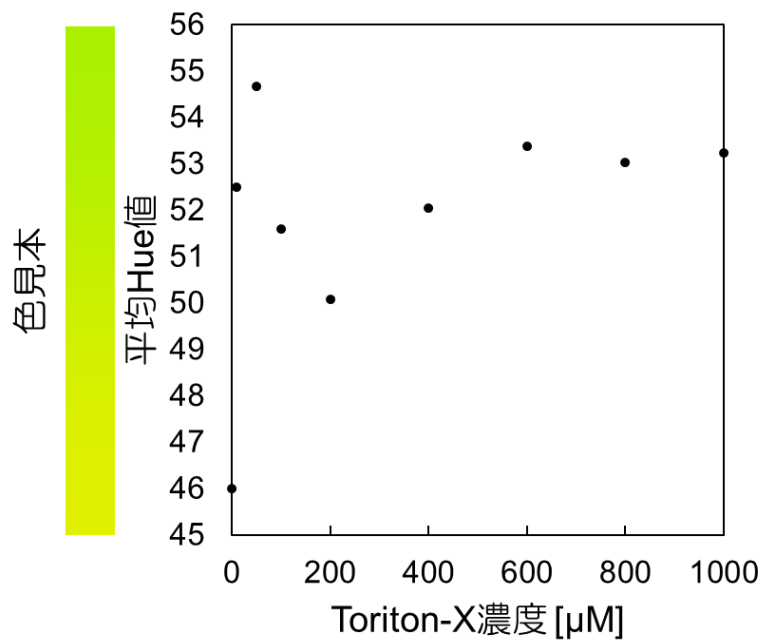


図 82. Toriton-X の吸着時の平均 Hue 値とその時の水溶液濃度

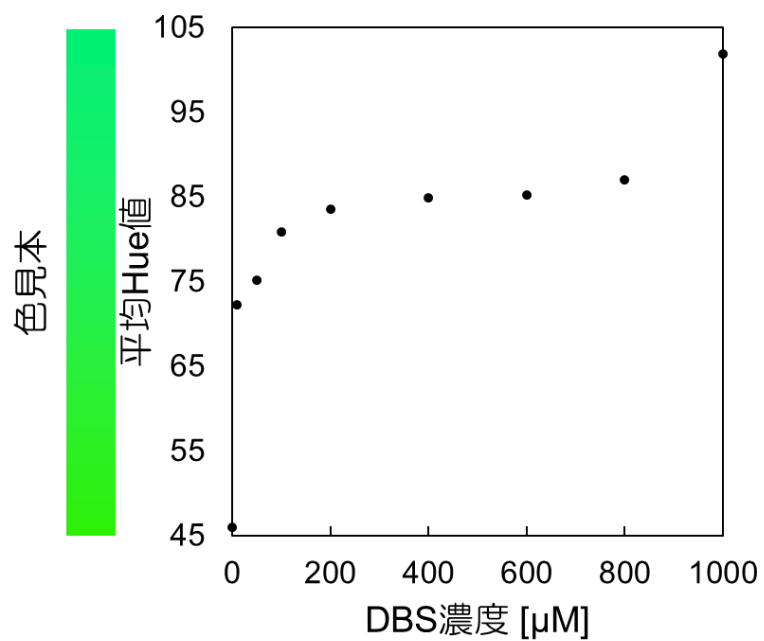


図 83. DBS の吸着時の平均 Hue 値とその時の水溶液濃度

図 80 より、ゲルセンサーの CPC への検出限界は 1000 μM であることがわかった。また、図 81 より、CPC と同じカチオン性界面活性剤である CTAB に対してもレシオメトリ

ックな応答を観測することができた。一方で、図 82、83 から Toriton-X や DBS などの非イオン界面活性剤やアニオン性界面活性剤に対しては上手く吸着せず、蛍光色変化がレスポメトリックな応答を観測できなかった。これは、アルギン酸ゲルのカルボキシ基を利用していることから妥当であり、今後においてその選択性向上するためにはカチオン性界面活性剤でも特定の化合物のみと応答するような吸着部位を用いるべきであることがわかった。

3.6 総論

この研究では、新規蛍光ソルバトクロミック色素 **13** を調製し、それをアルギン酸ゲルに共有結合させた。このアルギン酸色素複合体を用いた調査は、アルギン酸色素複合体が水溶液中に存在する場合でも鮮やかな蛍光を発することを示している。この現象は、アルギン酸水溶性ゲル上に固定化され、分散状態が保たれて自己消光を防止した結果と考えられる。

また、視覚的に観察可能な蛍光色の変化により、0~900 μM の範囲で CPC の濃度を定量的に決定するために色素複合体を使用できることも実証した。CPC によって促進されるゲルセンサーの蛍光波長のブルーシフトは、蛍光ソルバトクロミック色素の周囲に疎水性環境を作り出す界面活性剤の吸収によるものと考えられる。

ゲルセンサーの蛍光顕微鏡画像は、ImageJ ソフトウェアから計算された平均 Hue 値が CPC 濃度に応じて大きく異なることを確認した。Hue 値は、ミセルに取り込まれた蛍光ソルバトクロミック色素と取り込まれていないものとの比率によって線形近似される。したがって、広い濃度範囲で CPC 濃度を定量的に測定できることがわかった。

この研究で行われた観察は、適切な認識部位をアルギン酸ゲルに組み込むことにより、さまざまな界面活性剤および生物学的に関連する物質の新しいセンサーを設計できることを強く示唆している。

第 4 章 結論

4.1 結論

本研究では、水中に存在するイオンや有機物を測定する蛍光レシオメトリック新規センサー開発を目的としてその開発を行った。(図 84)

	ポリスチレンセンサー 10	比較内容	ゲルセンサー 15
	ポリスチレン	ポリマー	アルギン酸
	クリック反応	ラベル化	アミド結合
	△	ソルバトクロミズムの活用	◎
	アミド基	認識部位の活用	カルボキシ基
	Caイオン	認識対象	CPC
	×	親水性	○

図 84. 第 2 章及び第 3 章で開発したセンサーのまとめ

第 2 章では、ポリペプチド合成などに用いられているメリフィールドレジンをを用いて、蛍光ソルバトクロミック色素 6 を導入することによりレジンスセンサー 10 を開発することに成功した。この際には、等量制御を用いて FT-IR の測定結果から段階的に蛍光ソルバトクロミック色素をクリック反応で導入することに成功した。また、同様にイオン認識部位となるアミド基を持ったエチニル化合物 7 を導入する際にも段階的な反応を示すことを観測することができた。特に、エチニル化合物 7 を導入する場合には、先にクリック反応をした状態であっても同様に反応させることができたことから、メリフィールドレジンをを用いたクリック反応での複数の目的物を別々に合成させていくことで、同時にメリフィールドレジン上に存在させることが可能であることが分かった。

レジンスセンサー 10 の性能評価には光導波路分光装置を用いた測定を行った。この測定の結果、0.1M の $\text{Ca}(\text{ClO}_4)_2$ のアセトニトリル溶液に対して蛍光色大きくブルーシフトする (538 nm から 511 nm) ことを観測することができた。この観測の際には、イオン認識部位が含まれているかどうかで蛍光色がどのように変化するかも確認した。この結果、イオン認識部位が含まれていない場合、蛍光色があまり変化しない (510 nm から 500 nm) ことが分かった。この結果から、蛍光ソルバトクロミック色素の周囲に導入されたイオン認識部位が持つアミド結合の溶媒和が大きく影響していることが分かる。

しかし、目的としていた水中での観測では蛍光が発せられず、その変化を見ることができなかった。これは、メリフィールドレジンはポリスチレンを主鎖に持つポリマーであり、有機溶媒中の方がより膨潤率が高くなることから、水中では自己消光してしまったことが原因として考えられる。このことから、より親水性の高い固相を用いる必要があることが分かった。

第 3 章では、第 2 章の知見を基に親水性の高いポリマーとしてアルギン酸を用いた。アルギン酸はほぼ水にしか溶解しないが、その構成にはカルボキシ基を持った糖鎖が含まれていることから、蛍光ソルバトクロミック色素の導入はしやすいと考えられた。本研究では蛍光ソルバトクロミック色素の供与基側にアミノ末端を導入することで容易に蛍光ソル

バトクロミック色素 **13** の導入に成功した。作製したゲルセンサー**15** の CPC に対する応答を観測する際には、画像解析を用いた。

この評価を行うために、無修飾のアルギン酸ゲルビーズとゲルセンサー**15** の挙動が同様になるかを確認し、同様な挙動を示された。

次に、静置した状態での吸着挙動と蛍光色変化の関係を確認した。この結果、アルギン酸ゲルを球体で用いる場合、倒立顕微鏡を用いた画像よりも正立型顕微鏡を用いた方が良いことが分かった。

最後に、CPC 水溶液中でゲルセンサー**15** の実際に色変化が濃度によってどのように変化するかを振とう条件下で確認した。この結果、水溶液中の CPC 濃度が 1 mM まで増える中で蛍光発光色はライム色(約 580nm)から緑黄色(約 540nm)に変化し、波長極大がブルーシフトした。両方の現象は、共有結合した蛍光ソルバトクロミック色素を取り巻く環境の極性の低下を引き起こすアルギン酸錯体への CPC 吸収の結果である可能性が高い。

また、その際の標準偏差は **15a** が 10.23、**15b** では標準偏差 が 0.36 となった。さらに、0~50 μM の範囲のこれらのプロットの傾きを使用して、CPC 濃度の定量下限が **15a** で 0.035 μM 、**15b** で 0.068 μM であることがわかった。このことから、界面活性剤濃度と Hue 値との間に相関関係が存在することは、**15a,b** が CPC にとって良好なセンサーであることを示した。CPC の CMC は 900 μM 程度であるため、水溶液中にミセルが存在しない範囲でも、**15a,b** は CPC 濃度に定量的に応答することが示唆された。

また、その蛍光色変化の観察結果を調べると **15a** では吸着量と蛍光色変化の間にほぼ直線的な関係があることが分かった ($R^2=0.97$)。

以上から、本研究で目的としていた水中での利用可能な蛍光波長のレシオメトリックな変化を定量的に観察するセンサーの開発ができたと考えられる。このため、今後の目標としては、親水性があり、吸着能がないポリマーを固相として用いることで、親水性の確保とセンサーとしての特異性を保つ検討をすることで、選択性の向上を達成できると考えられる。また、この際には蛍光ソルバトクロミック色素には、今回と同様にピペラジン骨格を用いるとラベル化と蛍光強度の両立を達成できると考えられる。また、認識部位としては、特異性の高いものを用いることで、さらにカルボキシ基やアミド基よりも選択性を高められると考えられる。(図 85)

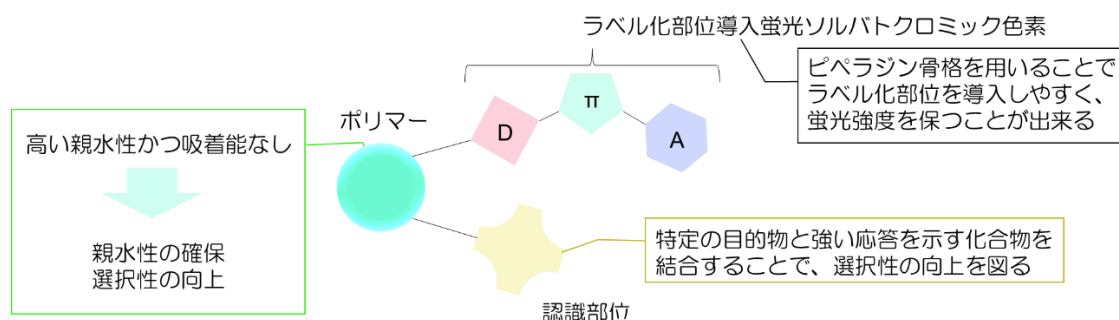


図 85. 今後の目標とする新規センサー開発の模式図

References

1. Nanjo, M. (2021) 分析化学実技シリーズ 応用分析編 2 化学センサ・バイオセンサ, 共立出版株式会社
2. Cermer, M.; Biol. Z. Origin of electromotor properties of tissues, and instructional contribution for polyphasic electrolyte chains. *Zeitschrift fuer Biologie (Munich)* **1906**, *47*, 562-608.
3. Yang, J.; Chen, S.; Fang, Y. Viscosity study of interactions between sodium alginate and CTAB in dilute solutions at different pH values. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *75*, 333-337. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.07.037>.
4. Yang, J.; Zhao, J.; Fang, Y. Calorimetric studies of the interaction between sodium alginate and sodium dodecyl sulfate in dilute solutions at different pH values. *Carbohydr. Res.* **2008**, *343*, 719-725. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.010>.
5. Bu, H.; Kjørnsen, A.L.; Knudsen, K.D.; Nyström, B. Characterization of interactions in aqueous mixtures of hydrophobically modified alginate and different types of surfactant. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* **2007**, *293*, 105-113. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.07.028>.
6. Otsuka, Y. Synthesis of fluorescent solvatochromic beads via Suzuki-Miyaura cross-coupling on the surface and its optical waveguide spectra to fabrication of bio-affinity sensing device. Sapporo, Hokkaido University, **2021**, *Ph. D. thesis*.
7. Bayer, E.A.; Wilchek, M. Application of avidin-biotin technology to affinity-based separations. *J. Chromatogr.* **1990**, *510*, 3-11, doi:10.1016/S0021-9673(01)93733-1.
8. Guesdon, J.-L.; Ternynck, T.; Avrameas, S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem.* **1979**, *8*, 1131-1139, doi: 10.1177/27.8.90074.
9. Luong, J.H.T.; Male, K.B.; Glennon, J.D. Biotin interference in immunoassays based on biotin-strept(avidin) chemistry: An emerging threat. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 634-641, doi:10.1016/j.biotechadv.2019.03.007.
10. Hafuka, A.; Satoh, H.; Yamada, K.; Takahashi, M.; Okabe, S. 3-[Bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]-5-(4-carboxyphenyl)- BODIPY as Ratiometric Fluorescent Sensor for Cu²⁺, *Materials*, **2018**, *11*, 814. <https://doi.org/10.3390/ma11050814>.
11. Suzuki, T.; Nishida, J.; Tsuji, T. Hexaphenylethane Derivatives Exhibiting Novel Electrochromic Behavior. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1997**, *36*, 1329-1331. <https://doi.org/10.1002/anie.199713291>.
12. Silva, A. P.; Moody, T. S.; Wright, G. D. Fluorescent PET (Photoinduced Electron Transfer) sensors as potent analytical tools. *Analyst*, **2009**, *134*, 2385-2393.

<https://doi.org/10.1039/B912527M>

13. Takagi, M.; Nakamura, H.; Ueno, K. A Novel Colorimetric Reagent for Potassium Based on Crown Ether Complex Formation. *Anal. Lett.*, **1977**, *10*, 1115-1122.
<https://doi.org/10.1080/00032717708067847>.
14. Móczár, I.; Huszthy, O.; Maidics, Z.; Kádár M.; Tóth, K. Synthesis and optical characterization of novel enantiopure BODIPY linked azacrown ethers as potential fluorescent chemosensors. *Tetrahedron*, 2009, **65**, 8250–8258.
<https://doi.org/10.1016/j.tet.2009.07.061>.
15. Baruah, M.; Qin, W.; Vallée, R. A. L.; Beljonne, D.; Rohand, T.; Dehaen, W.; Boëns, N.; A Highly Potassium-Selective Ratiometric Fluorescent Indicator Based on BODIPY Azacrown Ether Excitable with Visible Light. *Org. Lett.*, 2005, **7**(20), 4377-4380. <https://doi.org/10.1021/ol051603o>.
16. Domaille, D. W.; Zeng, L.; Chang, C. J. Visualizing Ascorbate-Triggered Release of Labile Copper within Living Cells using a Ratiometric Fluorescent Sensor. *J Am. Chem. Soc.*, 2010, **132**, 1194. doi: 10.1021/ja907778b.
17. Isaad, J.; Achari, A. E. BODIPY modified silica coated magnetite nanoparticles as fluorescent hybrid material for Cu (II) detection in aqueous medium. *Dyes and Pigments*, 2013, **99**, 878-886. <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2013.07.031>.
18. Niu, L.; Li, H.; Feng, L.; Guan, Y.; Chen, Y.; Duan, C.; Wu, L.; Guan, Y.; Tung, C.; Yang, Q. BODIPY-based fluorometric sensor array for the highly sensitive identification of heavy-metal ions. *Analytica Chimica Acta*, 2013, **775**, 93-99.
<https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.03.013>
19. Que, E. L.; Bleher, R.; Duncan, F. E.; Kong, B. Y.; Gleber, S. C.; Vogt, S.; Chen, S.; Garwin, S. A.; Bayer, A. R.; Dravid, V. P.; Woodruff, T. K.; O'Halloran, T. V.; Quantitative mapping of zinc fluxes in the mammalian egg reveals the origin of fertilization-induced zinc sparks.
Nature Chemistry, 2015, **7**, 130-139. <https://doi.org/10.1038/nchem.2133>.
20. Gryniewicz, G.; Poenie, M.; Tsien, R. Y.; A New Generation of Ca²⁺ Indicators with Greatly Improved Fluorescence Properties. *J Biol Chem.* **1985**; *260*, 3440-3450. PMID: 3838314.
21. Fura 2-AM を用いた カルシウム イオン濃度変化測定 [https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/equipment/data/pdf/app_M200_Fura2.pdf] (2022.12.25 アクセス)
22. Maeshima, K.; Matsuda, T.; Shindo, Y.; Imamura, H.; Tamura S.; Imai R.; Kawakami, S.; Nagashima, R.; Soga, T.; Noji, H.; Oka, K.; Nagai, T.; A Transient Rise in Free Mg²⁺ Ions Released from ATP-Mg Hydrolysis Contributes to Mitotic Chromosome

- Condensation. *Current Biology*, **2018**, *28*, 444–451.
<https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.035>
23. *The Molecular Probes® Handbook A GUIDE TO FLUORESCENT PROBES AND LABELING TECHNOLOGIES 11th Edition* (2010).
 24. Son, S.H.; Yamagishi, Y.; Tani, M.; Yuasa, M.; Yamada, K. Spectral shifts of the environment-sensitive fluorophore POLARIC™ in heterogeneous interfaces. *Chem. Lett.* **2011**, *40*, 989–991. <https://doi.org/10.1246/cl.2011.989>.
 25. Merrifield, R.B. Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2149–2154, doi:10.1021/ja00897a025.
 26. Marshall, G.R. Solid-phase synthesis: A paradigm shift. *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 534–544, <https://doi.org/10.1002/psc.478>.
 27. Krasinski, A.; Radić, Z.; Manetsch, R.; Raushel, J.; Taylor, P.; Sharpless, K. B.; Kolb, H. C. In Situ Selection of Lead Compounds by Click Chemistry: Target-Guided Optimization of Acetylcholinesterase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 6686. <https://doi.org/10.1021/ja043031t>.
 28. Castro, V.; Rodríguez, H.; Albericio, F. CuAAC: An Efficient Click Chemistry Reaction on Solid Phase. *ACS Comb. Sci.* **2016**, *18*, 1–14. <https://doi.org/10.1021/acscombsci.5b00087>.
 29. Arseniyadis, S.; Wagner, A.; Mioskowski, C. A straightforward preparation of amino-polystyrene resin from Merrifield resin. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 9717–9719. [https://doi.org/10.1016/S0040-4039\(02\)02192-5](https://doi.org/10.1016/S0040-4039(02)02192-5).
 30. Bowen, J. L. ; Kelly, M. A.; Gumbleton, M.; Davies, P. R.; Allender C. J. A simple zero length surface-modification approach for preparing novel bifunctional supports for co-immobilisation studies. *Tetrahedron Lett.* **2012**, *53*, 3727 – 3730. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2012.04.116>
 31. Castro, V.; Rodriguez, H.; Albericio, F. Wang Linker Free of Side Reactions. *Org. Lett.*, **2013**, *15*, 246-249. <https://doi.org/10.1021/ol303367s>.
 32. Chen, G.; Tao, L.; Mantovani, G.; Ladmiral, V.; Burt, D. P.; Macpherson, J. V.; Haddleton, D. M. Synthesis of azide/alkyne-terminal polymers and application for surface functionalisation through a [2 + 3] Huisgen cycloaddition process, “click chemistry”. *Soft Matter*, **2007**, *3*, 732–739. <https://doi.org/10.1039/B618325E>.
 33. Larik, F. A.; Saeed, A.; Fattah, T. A.; Muqadar, U.; Channar P. A. Recent advances in the synthesis, biological activities and various applications of ferrocene derivatives. *Appl Organometal Chem.* **2017**; *31*:e3664. <https://doi.org/10.1002/aoc.3664>.
 34. Ouerghui, A.; Elamari, H.; Ghammouri, S.; Slimi, R.; Meganem, F.; Girard, C. Polystyrene-supported triazoles for metal ions extraction: Synthesis and evaluation.

Reactive & Functional Polymers. **2014**, *74*, 37–45.
<https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2013.10.007>.

35. Halil, I.; Okur Jaibir Kherb, and Paul, S. Cremer, Cations Bind Only Weakly to Amides in Aqueous Solutions, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 5062–5067.
<https://doi.org/10.1021/ja3119256>.
36. Takahashi, T.; Emura, S. Alginic acid as a cation exchanger, *生産研究* 12(2), 47-52, 1960-02, ISSN:0037105X.
37. Zhang, W.; Xu, F.; Wang, Y.; Luo, M.; Wang, D. Facile control of zeolite NaA dispersion into xanthan gum–alginate binary biopolymer network in improving hybrid composites for adsorptive removal of Co²⁺ and Ni²⁺, *Chemical Engineering Journal*. **2014**, *255*, 316–326. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2014.06.024>.
38. Yang, J.; Chen, S.; Fang, Y. Viscosity study of interactions between sodium alginate and CTAB in dilute solutions at different pH values, *Carbohydrate Polymers*. **2009**, *75*, 333–337. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.07.037>.
39. Yang, J.; Zhao, J.; Fang, Y. Calorimetric studies of the interaction between sodium alginate and sodium dodecyl sulfate in dilute solutions at different pH values, *Carbohydrate Research*. **2008**, *343*, 719–725.
<https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.010>.
40. Bu, H.; Kjøniksen, A. L.; Knudsen K. D.; Nyström, B. Characterization of interactions in aqueous mixtures of hydrophobically modified alginate and different types of surfactant. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. **2007**, *293*, 105–113.
41. Obeid, L.; Kolli, N. E.; Dali, N.; Talbot, D.; Abramson, S.; Welschbillig, M.; Cabuil, V.; Bée, A. Adsorption of a cationic surfactant by a magsorbent based on magnetic alginate beads. *Journal of Colloid and Interface Science*. **2014**, *432*, 182–189.
<https://doi.org/10.1016/j.jcis.2014.06.027>.
42. Lim, J.; Lee, E. J.; Choi, J. S.; Jeong, N. C. Diffusion Control in the in Situ Synthesis of Ionic Metal–Organic Frameworks within an Ionic Polymer Matrix. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **2018**, *10*, 3793–3800.
<https://doi.org/10.1021/acsami.7b17662>.
43. Fujiwara, Y.; Maeda, R.; Takeshita, H.; Komohara, Y. Alginates as food ingredients absorb extra salt in sodium chloride-treated mice. *Heliyon*. **2021**, *7*, e06551.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06551>
44. Haug, A.; Smidsrød, O.; Larsen, B.; Gronowitz, S.; Hoffman, R. A.; Westerdahl, A. The Effect of Divalent Metals on the Properties of Alginate Solutions. II. Comparison of Different Metal Ions. *Acta. Chem. Scand.* **1965**, *19*, 341 - 351.

<https://www.doi.org/10.3891/ACTA.CHEM.SCAND.19-0341>.

45. Tanimoto, Y.; Noro, S. Influence of carbohydrate polymer shaping on organic dye adsorption by a metal-organic framework in water. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 23707–23713. <https://doi.org/10.1039/d1ra03348d>.
46. Grant, G. T.; Morris, E. R.; Rees, D. A.; Smith, P. J. C. Thom, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. *FEBS Letters.* **1973**, *32*, 195-198. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(73)80770-7).
47. Morris, E. R.; Rees, D. A.; Thom, D.; Boyd, J. Chiroptical and stoichiometric evidence of a specific, primary dimerisation process in alginate gelation, *Carbohydrate Research*, **1978**, *66*, 145-154. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(00\)83247-4](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(00)83247-4).
48. Li, P.; Müller, M.; Chang, M. W.; Frettlöh, M.; Schönherr, H. Encapsulation of Autoinducer Sensing Reporter Bacteria in Reinforced Alginate-Based Microbeads. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, *9*, 22321–22331. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b07166>.
49. Lilhare, S.; Mathew, S. B.; Singh, A. K.; Carabineiro S. A. C. Calcium Alginate Beads with Entrapped Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Functionalized with Methionine—A Versatile Adsorbent for Arsenic Removal. *Nanomaterials* **2021**, *11*(5), 1345; <https://doi.org/10.3390/nano11051345>
50. Miura, K.; Tukada, Y. (2016) ImageJ ではじめる生物画像解析, 株式会社 学研メディアカル秀潤社
51. Kato, K.; Koyama, H. (2021) 実験医学別冊 達人に訊くバイオ画像取得と定量解析 Q&A 顕微鏡設定から ImageJ による解析・自動化まで, 株式会社 羊土社
52. TSUGEI, A.; OHASHI, A.; NAKASHIMA, Y.; TAKEUCHI, Y.; YAMADA, S.; IWATA, Y. Development of a method to evaluate the color tone of raw nori (*Pyropia yezoensis*) by using a digital camera and image analysis. *Bull. Jpn. Soc. Fish. Oceanogr.* **2013**, *77*, 274–281. ISSN: 09161562.
53. Levy, D. E.; Wang, D. X.; Lu, Q.; Chen, Z.; Perumattam, J.; Xu, Y. j.; Licican, A.; Higaki, J.; Dong, H.; Laney, M.; Mavunkel, B.; Dugar, S. Aryl-indolyl maleimides as inhibitors of CaMKII δ . Part 1: SAR of the aryl region, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Lett.* **2008**, *18*, 2390–2394. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.02.059>.
54. Yasuhiro, Y. Challenge to the world's first drug delivery system having a drug-concentration sensing function. Grants-in-Aid for Scientific Research's report 2013. <https://doi.org/10.14832/gsjdmd.2010f.0.29.0>.
55. Rey, S.G.; Ojeda, E.; Gunatilake, U.B.; Desmonts, L.B.; Lopez, F.B. Alginate Bead

- Biosystem for the Determination of Lactate in Sweat Using Image Analysis. *Biosensors*, **2021**, *11*, 379. <https://doi.org/10.3390/bios11100379>.
56. Sutthasupa, S.; Padungkit, C.; Suriyong, S. Colorimetric ammonia (NH₃) sensor based on an alginate-methylcellulose blend hydrogel and the potential opportunity for the development of a minced pork spoilage indicator. *Food Chem.* **2021**, *15*, 130151. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130151>.
57. Gunatilake, U.B.; Garcia-Rey, S.; Ojeda, E.; Basabe-Desmonts, L.; Benito-Lopez, F. TiO₂ Nanotubes Alginate Hydrogel Scaffold for Rapid Sensing of Sweat Biomarkers: Lactate and Glucose. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2021**, *13*, 37734–37745. <https://doi.org/10.1021/acsami.1c11446>.
58. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 31239, Cetylpyridinium Chloride. PubChem. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cetylpyridinium-chloride> (accessed on 8 October 2022).

謝辞

本研究を行うにあたり、数多くの方々にご支援・ご指導いただきました全ての方々に感謝の意を表します。

常日頃から熱く丁寧な指導・助言をいただきました、
北海道大学大学院 地球環境科学院 環境物質科学専攻 生体物質科学コース
山田 幸司 准教授
諸角 達也 助教

この場を借りて、深く感謝いたします。本当にありがとうございました。

本論文の副査でお世話になった、
北海道大学大学院 地球環境科学院 環境物質科学専攻 生体物質科学コース
沖野 龍文 教授

北海道大学 電子科学研究所
BIJU Vasudevan Pillai 教授

しっかりとした指導及び副査を引き受けていただき、ありがとうございました。

測定装置の貸出しと共に本論文の副査でもお世話になった、
北海道大学大学院 工学研究院 環境工学部門 環境工学分野 水環境保全工学研究室
佐藤 久 教授

装置を利用させていただくのご配慮いただくとともに、しっかりとした指導及び副査を引き受けていただき、ありがとうございました。

NMR 測定や機器の対応と共に本論文の副査でもお世話になった、
北海道大学大学院 地球環境科学院 環境物質科学専攻 生体物質科学コース
梅澤 大樹 准教授

NMR 室で声をかけていただくことで、実験を続ける気力を頂くとともに、しっかりとした指導及び副査を引き受けていただき、ありがとうございました。

ご卒業間際まで実験方法やゼミ、日々の実験に関する討論まで様々な面でお世話になりま

した、

南京経済大学 Li Guanglei 様

北海道立衛生研究所 大塚 侑 様

弘前大学 谷本 憂太郎 助教

有意義な研究室生活を送ることができました。本当にありがとうございました。

日々の実験を手伝っていただくほか、ゼミや飲み会を盛り上げてくれた、

北海道大学大学院 地球環境科学院 環境基学 博士 2 年

Shuai Zhang 氏

北海道大学大学院 地球環境科学院 環境物質科学専攻 生体物質科学コース 修士 1 年

市村 天 氏

楽しい日々をありがとうございました。これからも日々頑張ってください。

そのほか、多くの方々のご協力があったからこそ本研究を行うことができました。

また、末尾ではありますが、ここまでの 25 年間もの長かった学生生活を支えてきてくれた
両親および家族に感謝の意を表します。

皆様、本当にありがとうございました。

年 月 日

北海道大学大学院 地球環境科学院 環境物質科学専攻 生体物質科学コース 博士後期課程

参考

1. NMR の測定結果

1.1 ^1H NMR spectrum of **1** measured in CDCl_3 .

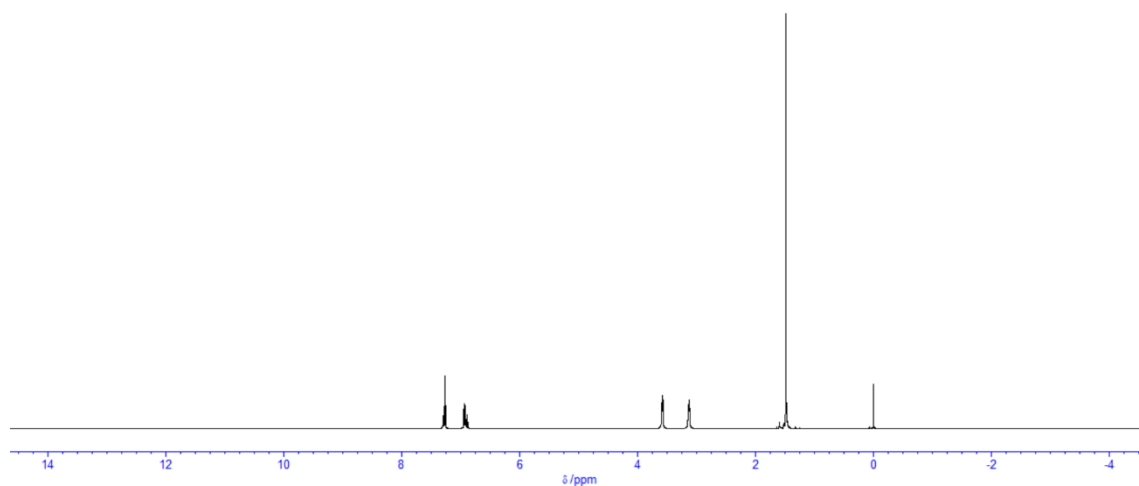


図 86.1 の ^1H NMR スペクトル測定結果

1.2 ^1H NMR spectrum of **2** measured in CDCl_3 .

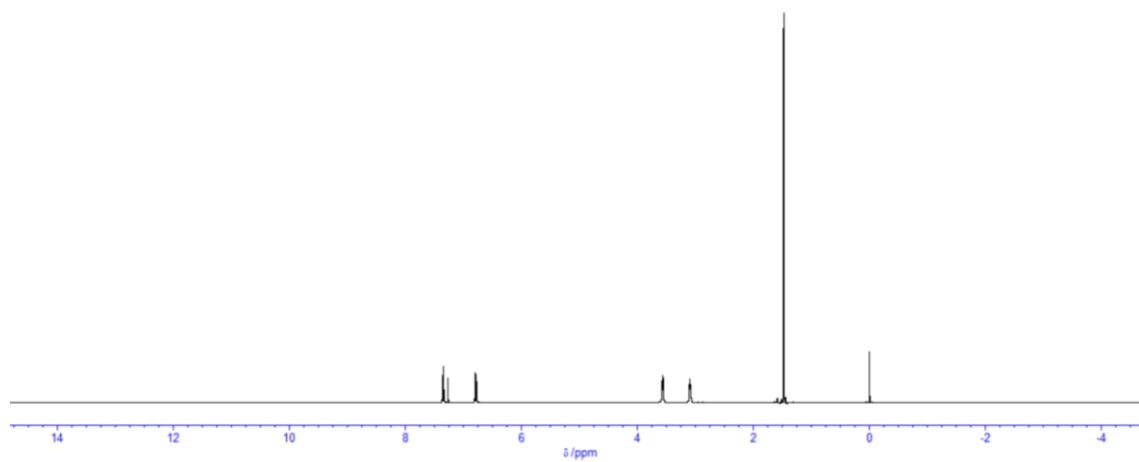


図 87.2 の ^1H NMR スペクトル測定結果

1.3 ^1H NMR spectrum of **3** measured in CDCl_3 .

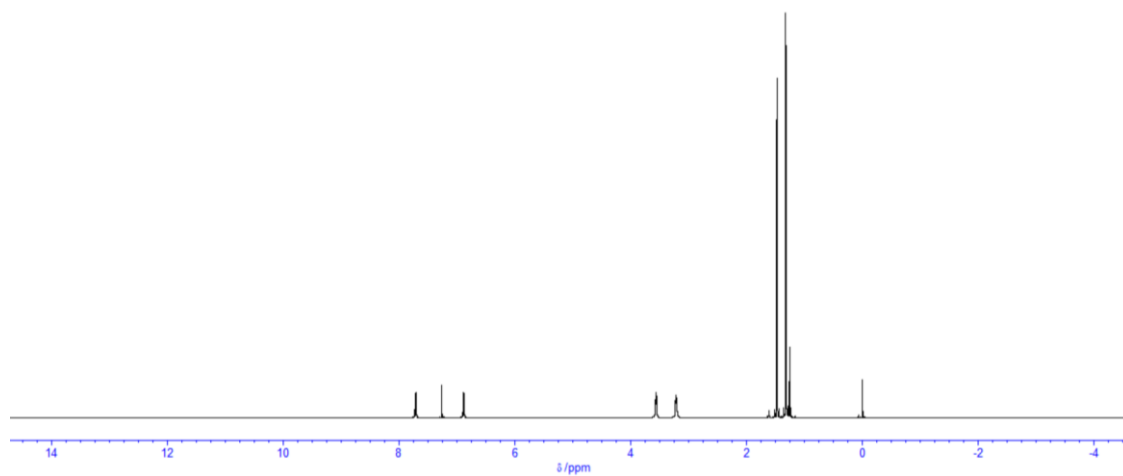


図 88. **3** の ^1H NMR スペクトル測定結果

1.4 ^1H NMR spectrum of **4** measured in CDCl_3 .

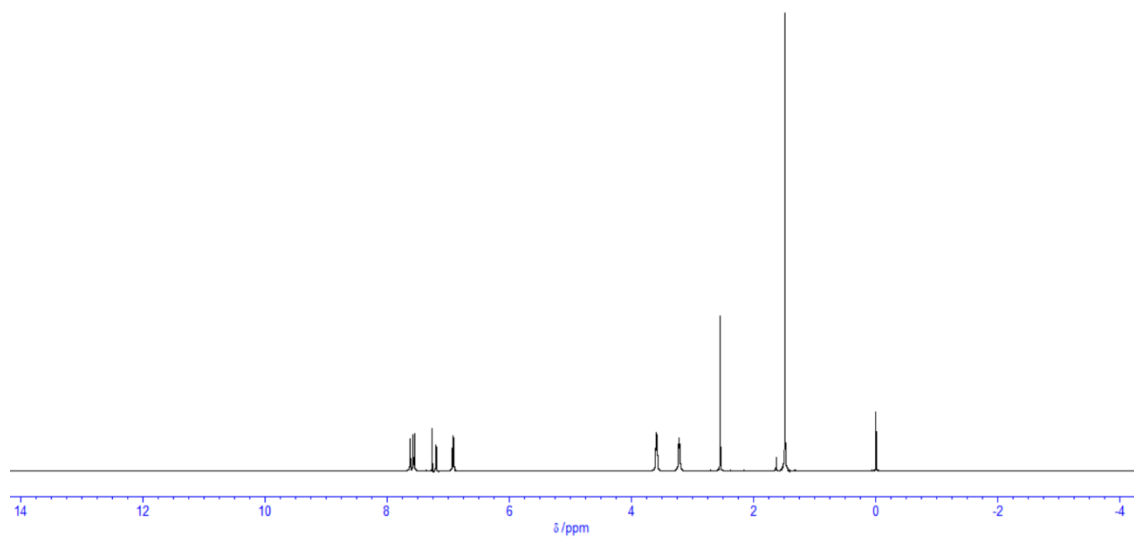


図 89. **4** の ^1H NMR スペクトル測定結果

1.5 ^{13}C NMR spectrum of **4** measured in CDCl_3 .

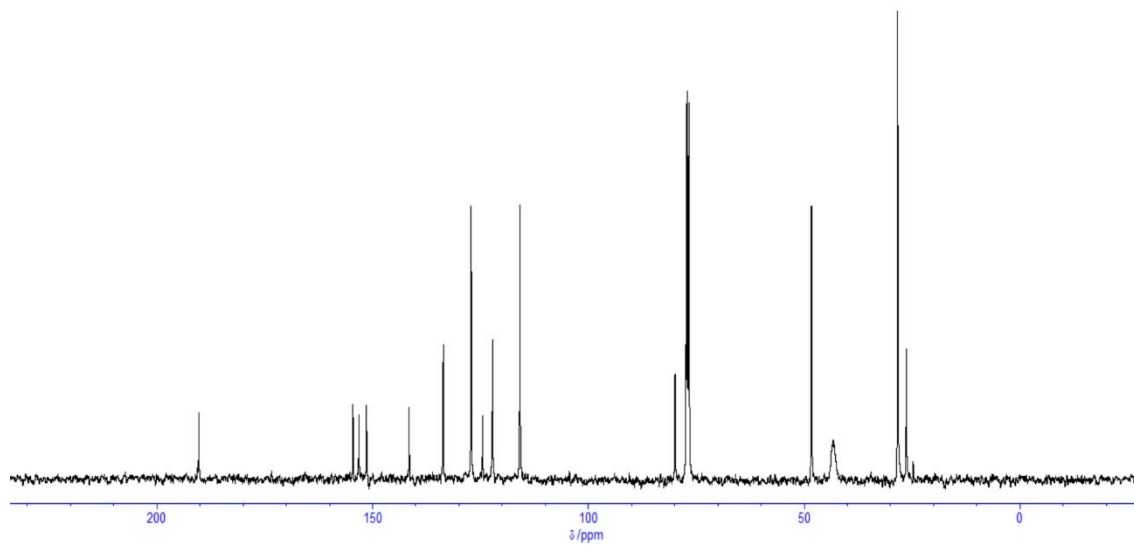


図 90. **4** の ^{13}C NMR スペクトル測定結果

1.6 ^1H NMR spectrum of **5** measured in CDCl_3 .

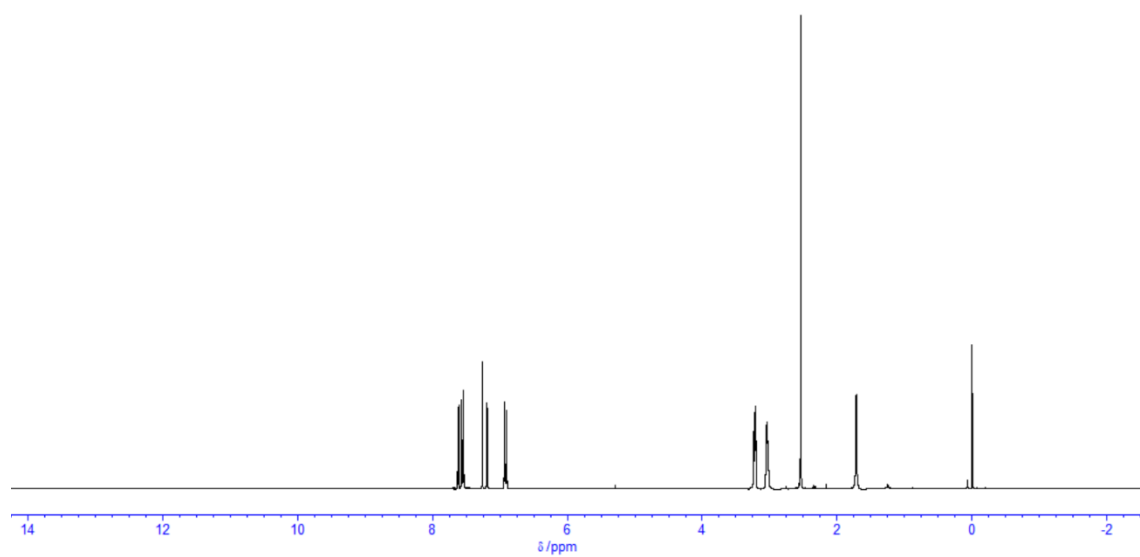


図 91. **5** の ^1H NMR スペクトル測定結果

1.7 ^{13}C NMR spectrum of **5** measured in DMSO.

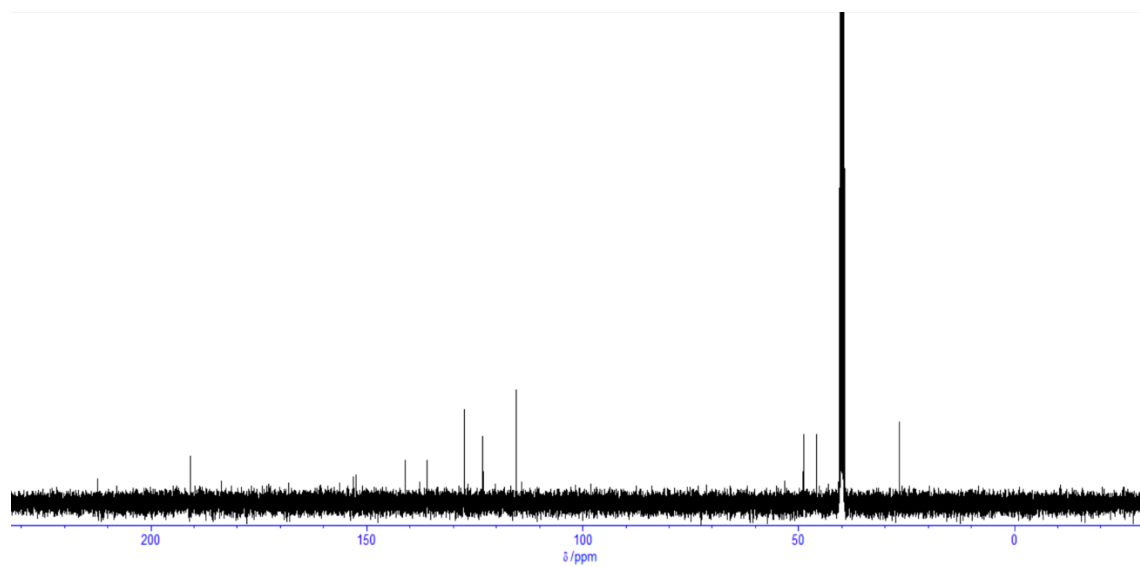


図 92. **5** の ^{13}C NMR スペクトル測定結果

1.8 ^1H NMR spectrum of **6** measured in CDCl_3 .

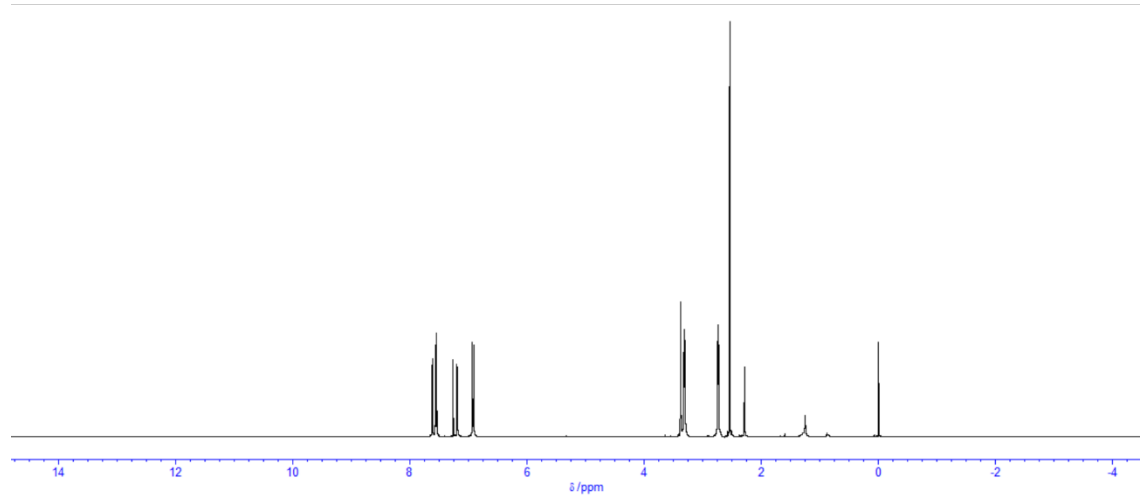


図 93. **6** の ^1H NMR スペクトル測定結果

1.9 ^{13}C NMR spectrum of **6** measured in CDCl_3 .

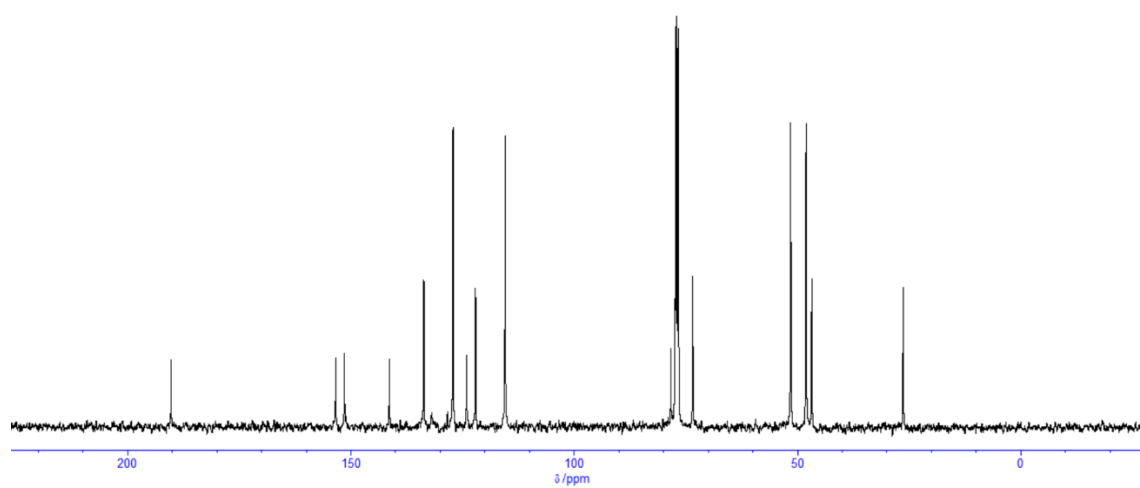


図 94. **6** の ^{13}C NMR スペクトル測定結果

1.10 ^1H NMR spectrum of **7** measured in CDCl_3 .

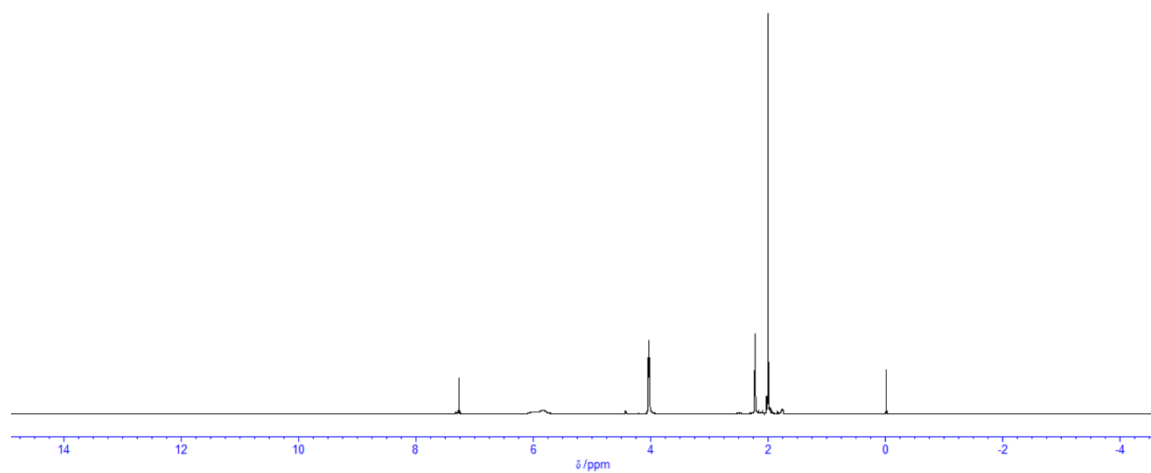


図 95.7 の ^1H NMR スペクトル測定結果

1.11. ^1H NMR spectrum of **11** measured in CDCl_3 .

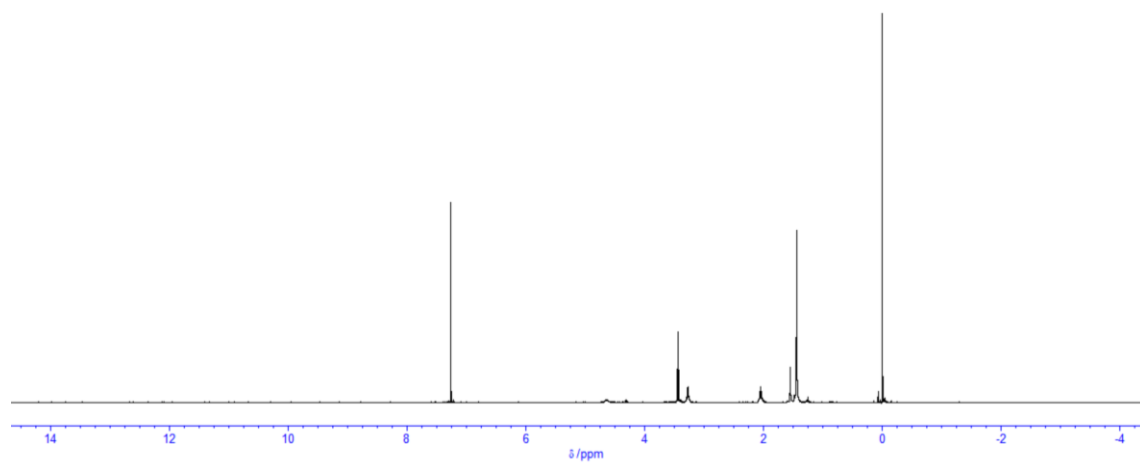


図 96. **11** の ^1H NMR スペクトル測定結果

1.12. ^1H NMR spectrum of **12** measured in CDCl_3 .

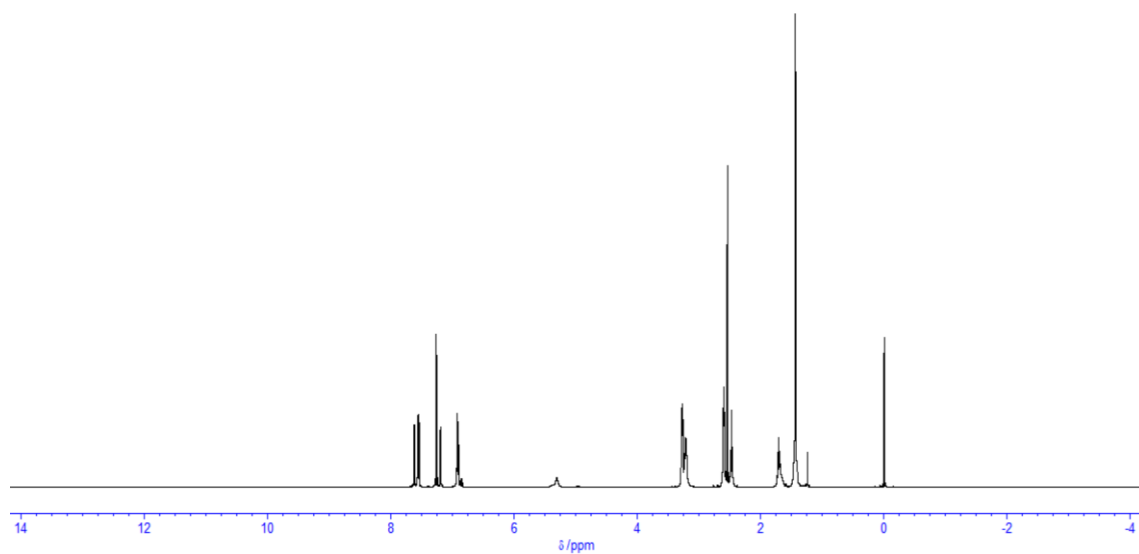


図 97. **12** の ^1H NMR スペクトル測定結果

1.13 ^{13}C NMR spectrum of **12** measured in CDCl_3 .

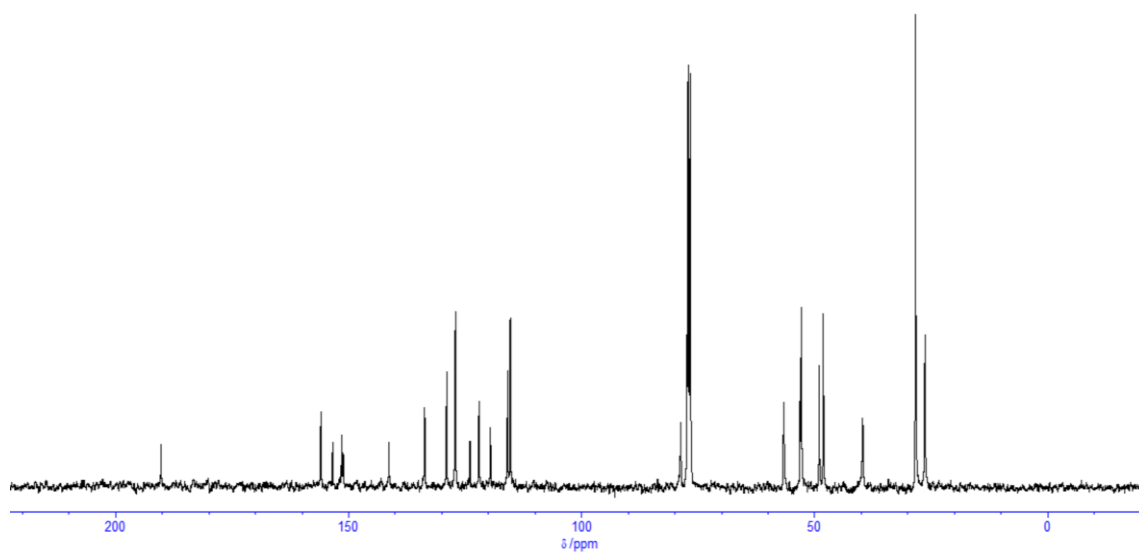


図 98. **12** の ^{13}C NMR スペクトル測定結果

1.14. ^1H NMR spectrum of **13** measured in CDCl_3 .

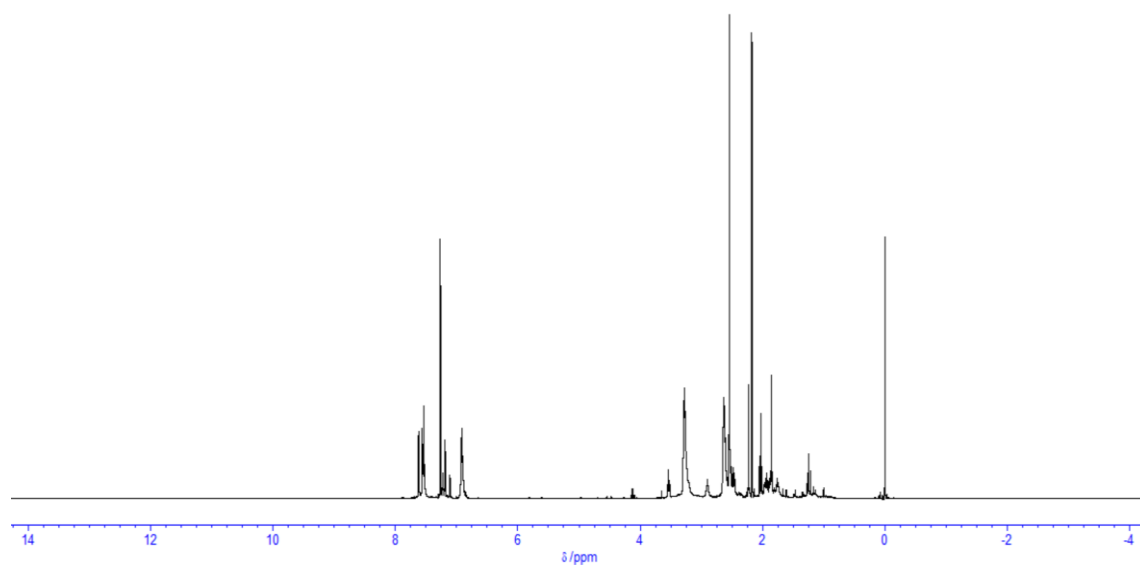


図 99. **13** の ^1H NMR スペクトル測定結果

2. 12 の吸光・蛍光スペクトル測定結果

2.1 12 の吸光スペクトルの測定結果

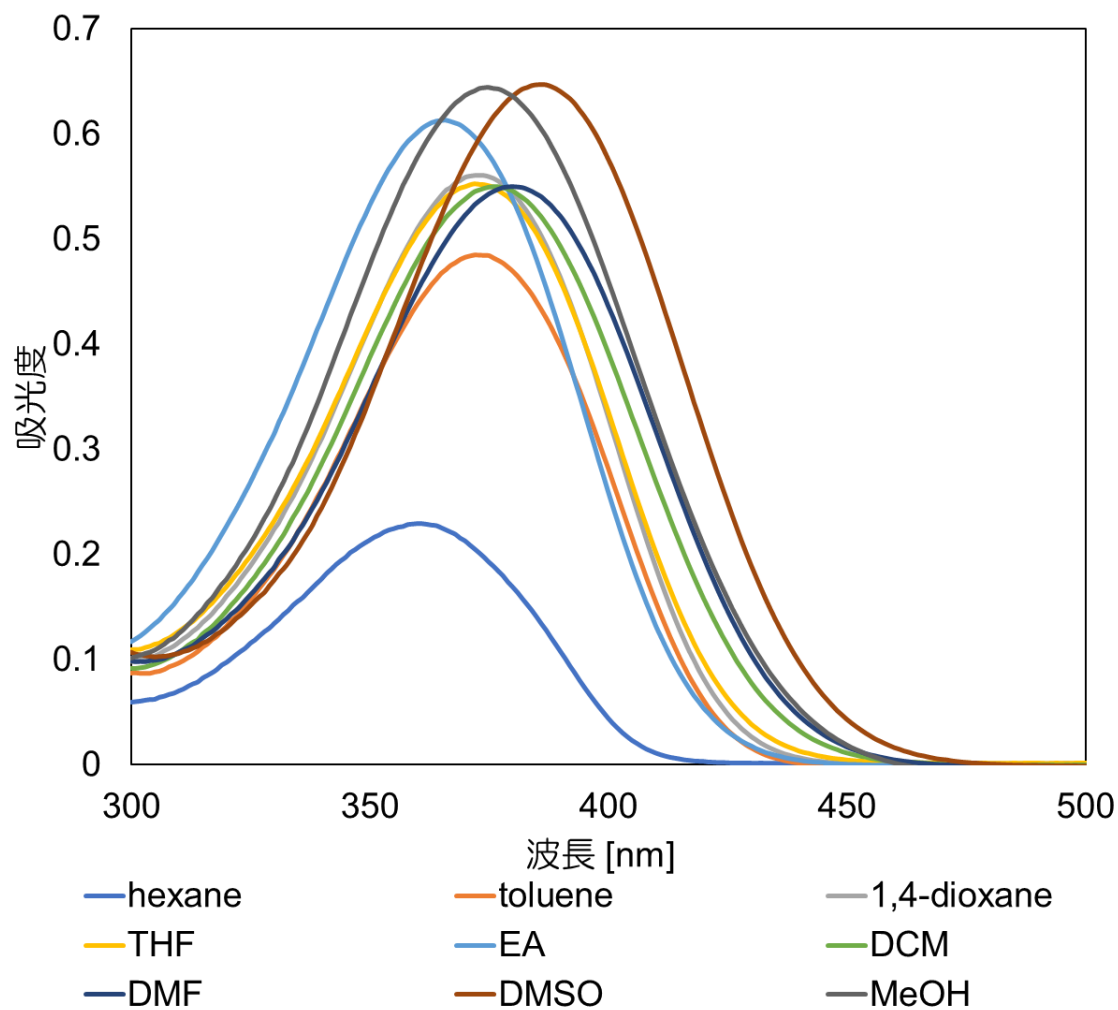


図 100. 12 の吸光スペクトルの測定結果

2.2 12 の蛍光スペクトルの測定結果

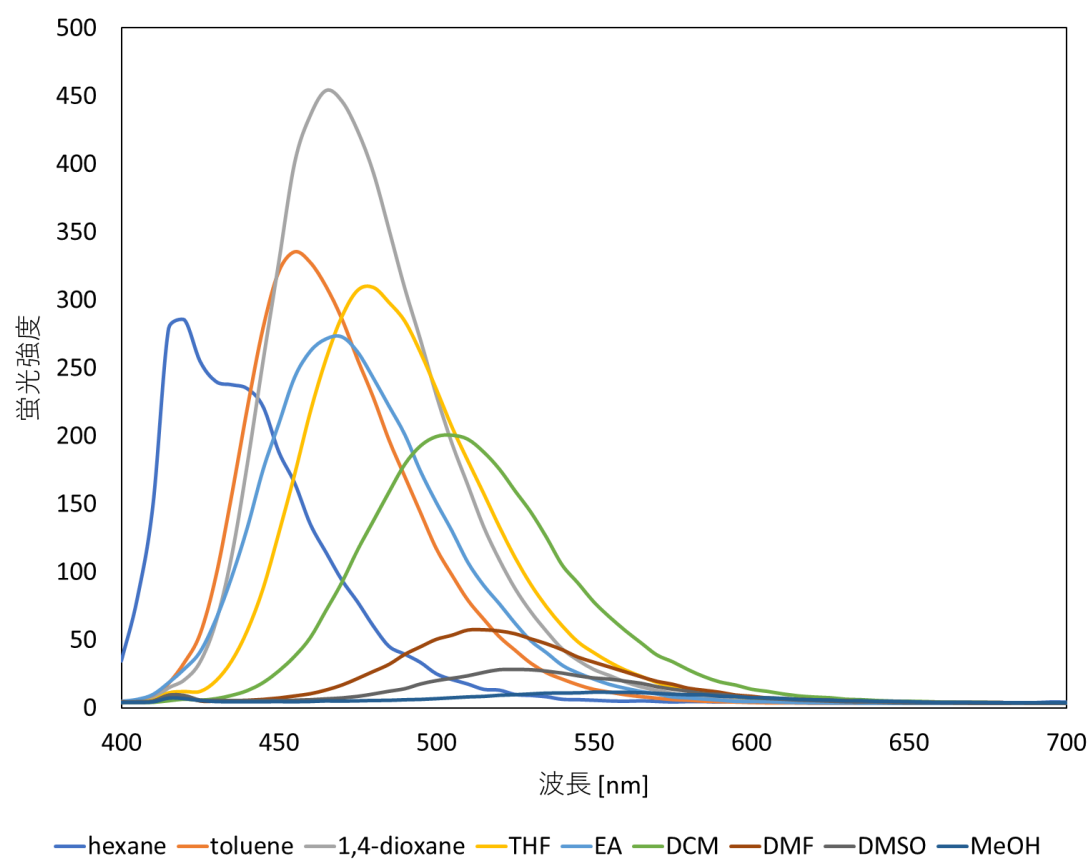


図 101. 12 の蛍光スペクトルの測定結果